UNIVERSITÉ DE CAEN — FACULTÉ DES SCIENCES

N° D'ORDRE

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE CAEN

POUR OBTENIR
LE GRADE DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

PAR

Jacques DELENTE

Ingénieur
des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIAA)

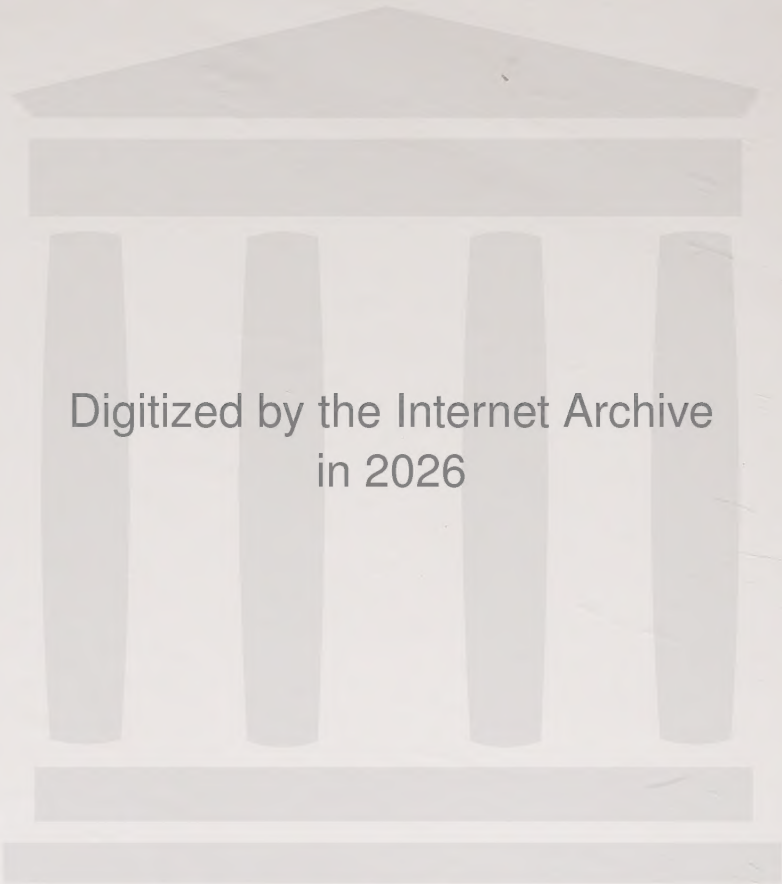
1re THESE. — Croissance et comportement des levures du genre « Saccharomyces » en milieu déficient en vitamines.

2e THESE. — La chromatographie en phase gazeuse, son application à l'étude des composés aromatiques du houblon.

JURY

M. JACQUET, Président
M. VIALLE, Mme STEEG, Suffrageants

1965


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547014_0015

CROISSANCE ET COMPORTEMENT DES LEVURES DU GENRE *SACCHAROMYCES* DANS UN MILIEU DÉFICIENT EN VITAMINES

UNIVERSITÉ DE CAEN — FACULTÉ DES SCIENCES

N° D'ORDRE

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE CAEN

POUR OBTENIR
LE GRADE DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

PAR

Jacques DELENTE

Ingénieur
des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIAA)

1re THESE. — Croissance et comportement des levures du genre « Saccharomyces » en milieu déficient en vitamines.

2e THESE. — La chromatographie en phase gazeuse, son application à l'étude des composés aromatiques du houblon.

JURY

M. JACQUET, Président
M. VIALLE, Mme STEEG, Suffrageants

UNIVERSITÉ de CAEN

FACULTÉ des SCIENCES — OL./MJ.

ANNEE SCOLAIRE 1965-1966

PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTE DES SCIENCES

MM. LOZAC'H, Doyen, Professeur (Chimie)
DANGEARD, Professeur (Géologie)
SCHERER, Professeur (Physique générale)
APERY, Professeur (Mathématiques pures)
JACQUET, Professeur (Microbiologie)
PITOT, Professeur (Botanique)
CAMPBELL, Professeur (Mécanique rationnelle)
VIALLE, Professeur (Chimie)
COJAN, Professeur (Physique)
PALLU de la BARRIERE, Professeur (Mathématiques)
PHAM, Professeur (Mathématiques)
GIACOMO, Assesseur, Professeur (Physique)
MONIER, Professeur (Minéralogie)
CONIA, Professeur (Chimie)
PAREYN, Professeur (Géologie)
Mme GAYRAL, Professeur (Botanique)
MM. ROMANET, Professeur (Chimie Générale)
BINET, Professeur (Botanique)
THUREAU, Professeur (Physique)
NATAF, Professeur (Mathématiques)
PINAZZI, Professeur (Chhimie)
RYBAK, Professeur (Physiologie animale)
LUBET, Professeur (Zoologie)
DOGUET, Professeur sans chaire (Biologie végétale)
MABBOUX-STROMBERG, Professeur sans chaire (Physique)
BERNARD Maurice, Professeur sans chaire (Chimie)
BARRAT, Professeur sans chaire (Physique)
LEGROS, Professeur sans chaire (Physique)
GAULT, Professeur sans chaire (Chimie)
Mlle DEMEUSY, Professeur sans chaire (Biologie)
Mme BLANCHETON, Professeur sans chaire (Mathématiques)
MM. DESCHANVRES, Professeur sans chaire (Chimie)

THUILLIER, Professeur sans chaire (Chimie)

MOLLIER, Maître de conférences (Chimie)

KAUFFMANN, Maître de conférences (Microbiologie du sol)

SIGNORET, Maître de conférences (Zoologie)

PONS, Maître de conférences (Physique appliquée)

FORTINI, Maître de conférences (Electronique)

HERVE, Maître de conférences (Mécanique appliquée)

LEHMANN, Maître de conférences (Physique)

BERNARD Jean, Maître de conférences (Mathématiques)

BOULET, Maître de conférences (Psychophysiologie)

Mme GRANDET, Maître de conférences (Mathhématiques M.P.C.)

M. MARGERIE, Moître de conférences (Physique)

Mme MALLIAVIN, Maître de conférences (Mathématiques)

MM. ZAREMBOWITCH, Maître de conférences (Physique)

CASALS, Maître de conférences (Chimie)

de PAPE, Chargé d'enseignement (Chimie)

CAUCAL, Conseiller Administratif, Chef des Services Administratifs de la Faculté des Sciences.

A MES PARENTS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements et ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Jacquet qui m'a beaucoup aidé au cours de ce travail et dont les conseils m'ont été fort précieux. Je remercie également la Falstaff Brewing Corporation pour m'avoir permis d'utiliser les recherches faites dans ses laboratoires pour cette thèse, et spécialement Messieurs Feeley, Akin, et Ladenburg, pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je prie Mme Steeg et M. Vialle, membre du Jury, qui ont bien voulu accepter de juger cette thèse, de croire à ma respectueuse reconnaissance.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I. — A) Introduction 11
B) Revue de littérature 12

CHAPITRE II. — Valeur et limites du typage par le bios dans la classification des levures 16
— Matériel et méthodes 17
— Résultats et discussion 22
— Conclusion 32

CHAPITRE III. — Croissance de quelques *Saccharomyces* en milieu avitaminé 33
— Matériel et méthodes 34
— Résultats et discussion 35
— Conclusion 39

CHAPITRE IV. — Sporulation et diploïdisation illégitime en milieu avitaminé 40
— Matériel et méthodes 41
— Résultats et discussion 42
— Conclusion 52

CHAPITRE V. — Etudes des espèces obtenues 53
— Matériel et méthodes 54
— Résultats et discussion 55
— Conclusion générale 61

APPENDICE. — Glossaire 63
— Bibliographie 66

CHAPITRE I.

A) Introduction

B) Revue de Littérature

A) INTRODUCTION

Ce travail a été commencé aux Etats-Unis d'Amérique en septembre 1962, dans les laboratoires de Recherche et Développement de la Falstaff Brewing Corporation, à Saint-Louis dans le Missouri.

Il a été continué à l'Université de Caen, dans le laboratoire de Microbiologie de la Falculté des Sciences, sous la direction de Monsieur le Professeur Jacquet.

Le sujet de cette thèse nous est venu par hasard, alors que nous tentions de caractériser les différentes souches de la Brasserie par leurs exigences en substances vitaminiques incorporées dans ce que Wildiers a appelé le Bios, en 1901. Pasteur avait déjà remarqué qu'une petite quantité de levure sèche suffisait pour faire pousser les levures en milieu synthétique. En 1921, Williams découvrit deux constituants de Bios, qu'il appela Bios I (mesoinostol) et Bios II (biotine). En 1938, il y ajoute l'acide pantothénique.

Nous nous sommes aperçus que quelques levures qui selon les critères généralement admis, exigeaient certaines vitamines pour leur croissance, finissaient par pousser normalement en milieu avitaminé si on leur en laissait le temps.

Nous avons tenté, dans ce travail, d'expliquer ce paradoxe.

B) REVUE DE LITTERATURE

Dès 1941, Leonian et Lilly se sont attaqués à l'étude de l'influence des vitamines sur la croissance des levures. Néanmoins, leurs résultats ne

furent pas très concluants à la suite d'erreurs expérimentales. En 1943, Burkholder découvrit que les levures montraient des différences très marquées dans leur croissance en présence ou en l'absence de certaines vitamines. En 1947, Schultz et Atkin reprirent des travaux commencés en 1942. Ils tentèrent alors d'utiliser ces différences pour la classification de plusieurs souches à l'intérieur d'une même espèce. C'est ce qu'ils ont appelé typage par le bios (Bios Typing). Ils ont ainsi établi six types de souches de *Saccharomyces Carlsbergensis.* Mais ils découvrent que dans le mécanisme de la fermentation, l'inositol joue un très grand rôle, même s'il n'est pas nécessaire à la croissance. La même année, Atkin, Moses et Gray utilisent le typage par le bios pour découvrir des mutations à la suite de la lyophilisation des levures. Puis, en 1954, des études furent poursuivies dans le monde entier sur l'influence des vitamines : en Italie, Verona et Picci font une étude auxologique des levures du vin. Nakanishi et Tsukahara au Japon confirment que la biotine, le pantothénate de calcium et la thiamine sont essentiels à la croissance des levures, En 1959, Weinfurtner et Eschenbecher montrent que la biotine et l'inositol stimulent la croissance de *Saccharomyces Carlsbergensis.* En 1958, Windisch et Herbst font paraître une étude portant sur 51 souches.

D'après leurs travaux, 72 % des souches de *Saccharomyces Carlsbergensis* n'ont besoin que de biotine pour leur croissance et 61 % des souches de *Saccharomyces Cerevisiae* n'ont besoin que de biotine et de pantothénate de calcium. Ces résultats sont confirmés par Streutker en 1959, qui dans son étude portant sur 26 souches de *Saccharomyces Carlsbergensis* en a trouvé 22 qui n'exigent que la biotine, soit une proportion de 84 %. La même année, Green et Sullivan publient une méthode de détection des levures contaminantes en petit nombre dans la levure de bière. Cette technique est basée sur le typage par le bios ; elle est très précise d'après ces auteurs puisqu'ils ont pu détecter des contaminants qui existaient seulement dans la proportion de 10^{-6}. En 1961, Amaha et Takeushi introduisent un nouveau facteur dans cette recherche à l'aide du bios, à savoir la température, dont l'effet avait déjà été étudié par Ershoff pour les animaux supérieurs et par Campbell et Williams pour les bactéries. La conclusion en est que la plupart des souches de levures ont besoin de plus de facteurs de croissance à basse température (12° C.) qu'à température normale (25° C.). La même année, Suzuki prouve que les exigences en vitamines dépendent des sucres présents et surtout de la source d'azote utilisée. Cependant dès 1950, Lodder mentionne dans ses travaux de taxinomie, que beaucoup de levures montrent une prolifération normale dans un milieu absoluement dépourvu de vitamines, si on leur laisse assez de temps. En 1954, Peynaud et Lafourcade ont trouvé des souches de *Saccharomyces, Pichia, Hansenula* et *Torulopsis* qui n'ont besoin d'aucune vitamine pour leur développement. En 1955, Kirsop avait recommandé de tenir compte des différents types d'exigences : exigence absolue, adaptative ou partielle, car en 48 heures, on ne peut savoir à quel type on a affaire.

En 1960, Fukui et Tani trouvent une levure de distillerie qui n'a besoin d'aucun facteur de croissance. En 1962, Ahearn et Roth examinent 300 souches pour leurs exigences en vitamines, selon trois différentes méthodes. Ils ont également trouvé des souches qui n'avaient aucun besoin en bios. En 1964, Sarukanyan, Akhinyan et Kariimyan signalent que parmi 22 souches étudiées, une seule n'à pas besoin de biotine : *Candida Krusei.*

On a essayé de relier d'autres phénomènes physiologiques à la capacité de synthétiser les vitamines. En 1963, Goto essaie sans succès de trouver une relation entre les exigences en biotine et pantothénate de calcium et la formation des voiles dans les levures du vin. La synthèse du pantothénate de calcium a été reliée à la capacité de fermenter le raffinose. A l'absence de biotine et d'autres vitamines, Ribéreau-Gayon, Peynaud et Lafon ont rattaché certaines variations dans les produits secondaires de la fermentation alcoolique (1954).

En général, le rôle de ce facteur de croissance tel qu'on le reconnait, d'après les diverses publications à ce sujet, est la synthèse des acides carboxyliques à partir de gaz carbonique (Schaeffer et Barghava, [1962]). En l'absence de biotine, la perméabilité des membranes aux ions Cl^- et $H_2PO_4^-$ augmente (Rose, [1963]). La synthèse des lipides est beaucoup plus importante (Dixon et Rose [1964]).

Dans les organismes supérieurs, les effets sur la peau sont les plus visibles. A ce sujet, de nombreuses revues de littérature sur le rôle de la biotine ont été publiés. Nous ne citerons que les plus récentes : Terroine (1960), Axelrod et Martin (1961). Chez les rats, une alimentation sans biotine affecte la reproduction des descendants, (Rose, Communal et Mazella, [1956]). Les cellules de levure dans un tel milieu accumulent le 5-amino-imidazole, l'inositol et les nucléotides (Whitaker et Umbreit, [1962]). La biotine a également un rôle de régulation de synthèse des enzymes de *Saccharomyces Cerevisiae* (Fazal Ahmad et Rose, [1962]).

L'absence de biotine dans le milieu de Wickerham (1951) provoque des anomalies des cellules : leur membrane et leur cytoplasme se trouvent modifiés. Ces modifications disparaissent quand on ajoute de la biotine et réapparaissent si la biotine est en exès, (Kuraishi, [1957]).

En 1954, Tremaine et Miller montrèrent que les cellules de *Saccharomyces Cerevisiae* n'ont pas besion de facteurs de croissance pour la sporulation, à condition que le milieu de présporulation soit riche en biotine et en pantothénate de calcium.

Au sujet justement de la sporulation des levures, les notes les plus contradictoires apparaissent dans la littérature. Par exemple, Miller en 1959 rapporte que parmi d'autres substances, le glucose et les composés ammoniacaux sont des inhibiteurs de la sporulation. Cela revient à dire que la gélose de Corodkowa généralement utilisée pour la provoquer serait un très mauvais milieu de sporulation et, pourtant, il a fait et fait encore ses preuves. De toutes les publications récentes à ce sujet (Miller, Calvin,

Tremaine, [1954] ; Kleyn, [1954] ; Tremaine et Miller, [1956] ; Miller, Scheiber, Gabriel et Hoffman-Ostenhof, [1957,1959] ; Miller, [1963]), la seule conclusion que l'on puisse tirer c'est que pour la sporulation, il convient de faire passer la levure d'un milieu riche à un milieu plus pauvre, et c'est également ce qui ressortait déjà de multiples publications antérieures. Il est donc possible que des levures provenant d'un milieu au malt et passant au milieu de Wickerham puissent sporuler.

Sur la diploïdisation illégitime, les publications sont relativement peu nombreuses à notre connaissance. Cependant, depuis longtemps, on avait observé le phénomène de ségrégation dans les levures hétérozygotes (Kruis et Satava, [1937] ; Winge, [1935, 1942, 1944, 1947, 1949] ; Winge et Laustsen, [1937, 1938, 1939, 1940] ; Ditlevsen, [1944]). Les ségrégants obtenus par sporulation peuvent être très différents des parents, surtout du point de vue morphologique. Souvent, les quatre souches provenant des quatre spores d'une asque sont différentes entre elles.

C'est-à-dire qu'une telle levure est hétérozygote par plus d'un gène, qu'il y a en somme enjambement (crossing-over). Cependant, Winge déclare que toutes les cultures monospores fermentent les mêmes sucres que les parents, sans une seule exception. D'autre part, il a trouvé que beaucoup de levures sont homozygotes. Lindegren et Lindegren et leurs collaborateurs ont résumé leurs travaux dans un livre publié en 1949, « The Yeast Cell, Its Genetics and Cytology ». Comme les auteurs ci-dessus, ils ont également trouvé que beaucoup de levures sont hétérothalliques. Ils attribuent au thalles deux signes a et α. Les cultures monospores de signe a se conjuguent facilement à celles de signe α. Mais deux cultures de signe α se conjuguent rarement. La conjugaison du signe a avec le signe α est appelée copulation ou diploïdisation légitime, alors que la conjugaison de deux cellules d'une même culture haploïde monospore est appelée copulation ou diploïdisation illégitime. Les diploïdes illégitimes donnent des spores qui ne sont pas viables. Cependant, Winge et Roberts, en 1948, déclarent que l'hétérothallisme n'est pas aussi commun dans le genre *Saccharomyces* que les Lindegren le laissent entendre. Dans leurs expériences d'hybridisation, ces derniers auteurs, ainsi que Gilliland, en 1949, n'ont pas trouvé des ségrégations 2-2 comme on pourrait s'y attendre. Selon eux, plusieurs gènes sont responsables de la fermentation d'un sucre. Par exemple, *Saccharomyces Cerevisiae* en phase haploïde possèderait les gènes suivants : 1 gène dominant G (fermentation du galactose) ; deux gènes dominants et un gène recessif S1, S2, S3 (fermentation du saccharose et du raffinose) ; et trois gènes dominants M1, M2, M3 (fermentation du maltose). Cette interprétation génétique des levures, strictement mendélienne, n'est malheureusement pas vérifiée par les expériences de plusieurs auteurs, dont Lindegren et Lodder.

Lorsque la levure est haploïde, elle est facilement sujette à des mutations ou du moins, la mutation se manifeste immédiatement, car dans un diploïde normal, le gène muté récessif est souvent masqué par son allèle normal.

C'est pourquoi les diploïdes hétérozygotes présentent des qualités de stabilité supérieures aux haploïdes. Dans le cas d'un diploïde illégitime, les mutations récessives ne peuvent pas être masquées par des allèlles normaux. C'est pourquoi des mutations apparaissent également telles que :

> Formation de secteurs dans les colonies, mutations Smooth-Rough, déficiences respiratoires, apparitions de variants léthaux, polyploïdes, pertes d'enzymes, etc. (Henrici, 1941, 1947 ; Skumer, 1947 ; Bauch, 1941, 1942 ; Glaubitz et Hacha 1942 ; Glaubitz et Fink, 1943 ; Taysen et Morris, 1943 ; Sulramanian, 1945 ; Levan et Sandwell, 1943 ; Levan, 1944, 1946, 1947 ; Skovsted, 1948 ; Sonneborn, 1950 ; Ephrussi, 1949).

De même, en 1947, les Lindegren ont décrit la formation d'un pigment rouge par des mutants qui ont été obtenus par traitement d'une souche haploïde de *Saccharomyces Cerevisiae* au gaz de moutarde. Winge et Robert (1950) ont produit de tels mutants par les rayons X. Ephrussi et Lederer, en 1948, ont isolé ce pigment sans pouvoir l'identifier. Tout ce qu'on sait c'est qu'il ne s'agit pas d'un pigment ferrique ni d'un pigment caroténoïde.

Nous montrerons nous aussi, dans les pages suivantes que l'on ne peut accepter une simple interprétation mendélienne dans les mutations des levures.

CHAPITRE II

VALEUR ET LIMITES DU TYPAGE PAR LE BIOS DANS LA CLASSIFICATION DES LEVURES

A) Introduction.

B) Matériel et méthodes.

1) *Souches.*
2) *Milieux.*
3) *Instruments.*
4) *Méthodes.*

C) Résultats et discussion.

1) *Résultats.*
2) *Discussion.*

D) Conclusion : *Valeur et limites.*

A) *INTRODUCTION*

La revue de littérature précédente nous montre des points de vue différents au sujet de l'influence des vitamines sur la croissance des levures.

Les auteurs américains (Schultz, Atkin, Gray, Moses, Feinstein, Green, Patrick) nous proposent une méthode pour la classification des souches de levures d'une même espèce qu'ils ont expérimentée et ils se déclarent satisfaits des résultats obtenus.

D'un autre côté, les auteurs européens et japonais (Lodder, Kirsop, Windisch et Herbst, etc.) présentent des réserves, et surtout recommandent la prudence dans l'utilisation du typage par le bios.

En fait, les critiques adressées à la méthode américaine ne semblent pas très fondées car il ne faut voir là qu'un procédé de sub-classification, une sorte de recette pratique de laboratoire, dont les conditions sont et doivent rester très rigoureusement fixées :

Ensemencement faible (10 mg/litre).
Température constante : 25° C.
Temps d'incubation de 48 heures.
Observation par néphélométrie dans des conditions fixées.

Si l'on suit à la lettre ces recommandations, la technique s'avère très utile pour la détermination des souches. Ce qu'on peut reprocher aux auteurs c'est de ne pas avoir vraiment étudié le comportement des levures dans un milieu déficient.

D'après Lodder et Kirsop, certaines des exigences en vitamines sont temporaires. Et même au bout d'un certain temps, beaucoup de souches poussent dans un milieu avitaminé (Lodder, 1954). Un chercheur japonais, Takahashi (1954), a même découvert une levure qui poussait sans vitamines et sans avoir besoin d'un temps d'adaptation (souche Saké).

Le but de cette thèse est d'étudier le comportement des levures en milieu déficient en vitamines du group B (Bios). Dans ce premier chapitre nous prendrons comme point de départ les travaux de Atkin (et al.) et nous tenterons d'appliquer le typage par le bios à quelques souches de levure du genre Saccharomyces.

B) *MATERIEL ET METHODES*

1. Souches.

Les souches étudiées dans ce chapitre sont trois souches de *Saccharomyces Carlsbergensis,* une souche de *Saccharomyces Uvarum,* une souche de *Saccharomyces Logos,* et une de *Saccharomyces Cerevisiae.*

a) *Saccharomyces Carlsbergensis* PY 76.

Cette levure provient de la levure de bière de la Falstaff Brewing Corporation, Usine no. 10, 1920 Shenandoah Street, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis d'Amérique. Elle a été isolée par Feeley. Les études que nous avons faites sur cette levure ont conduit la société Falstaff à l'utiliser en culture pure dans plusieurs de ses usines.

b) *Saccharomyces Carlsbergensis* PY 74.

Cette levure a la même origine que la précédente. Mais ses qualités fermentaires et la nature organoleptique de la bière qu'elle produisait étaient inférieures à celles de PY 76 ; aussi n'a-t-elle pas été sélectionnée pour la culture pure.

c) *Saccharomyces Carlsbergensis* B 101.

Cette souche a été obtenue auprès de l'Institut Pasteur de Paris.

d) *Saccharomyces Uvarum* CLVUC.

Cette souche nous a été fournie par le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Caen. La forte proportion de cellules en forme de saucisse observées dans l'extrait de malt nous a incité à la ranger sans hésitation dans l'espèce *Saccharomyces Uvarum :* en effet,

la seule différence qui sépare *Saccharomyces Uvarum* de *S. Carlsbergensis* est uniquement morphologique (Lodder), les cellules de *S. Carlsbergensis* étant rondes ou ellipsoïdales, alors que les cellules de *S. Uvarum* sont en majorité allongées.

e) *Saccharomyces Logos* B 106.

Cette souche nous a été fournie par l'Institut Pasteur. Elle se différencie des précédentes, elle aussi, seulement par la morphologie des cellules. Si les cellules sont en général rondes, elles sont beaucoup plus grosses, en moyenne, que celles de *Saccharomyces Carlsbergensis.*

f) *Saccharomyces Cerevisiae* E 169.

Cette souche a été également obtenue de l'Institut de Pasteur. Elle se différencie de Saccharomyces Carlsbergensis par le fait qu'elle ne fermente pas le mélibiose (raffinose 1/3).

2. Milieux.

a) *Milieu de reproduction.*

— Extrait de malt à 4 %.
— Malt extract Difco.

b) *Milieu de conservation.*

— Gélose au moût de bière.
— Wort Agar Difco.

c) *Milieu d'étude des exigences en vitamines.*

— Milieu synthétique avitaminé de Wickerham (1951).
— Vitamin Free Yeast Base Difco.

d) *Milieu d'identification d'espèce*

i) Fermentation : eau vitaminée (Lodder, 1950).
ii) Assimilation : (Wickerham, 1951).
Yeast Nitrogen Base Difco.
iii) Morphologie : (Wickerham, 1951).
Yeast Morphology Agar Difco.

e) *Milieux de contrôle de pureté*

— Milieu synthétique au vert de bromocrésol de Green et Gray (1950).

i) Sans actidione : WL Nutrient Medium Difco.
ii) Avec actidione : WL Differential Medium Difco.

3. INSTRUMENTS.

a) *Micromanipulateur pneumatique « de Fonbrune ».*

Ets Charles Beaudouin (avec tous les accessoires : micro-forge, porte-outils, etc.).

b) *Microscope Leitz* à statif inversé pour la micro-manipulation.

c) *Microscope Stiassnie* pour l'observation courante.

d) *Microscope Wild* pour la photographie avec une boîte Plaubel.

e) *Photomètre de Jobin-Yvon* pour les contrôles de concentration d'ensemencement et l'étude de la croissance en milieu déficient.

N.B. — Pour les souches PY 74 et PY 76 les mesures ont été effectuées aux Etats-Unis d'Amérique sur un colorimètre Klett Summerson à 440 mμ. L'isolement a été fait avec un micromanipulateur Leitz à liaisons mécaniques. Les résultats du calorimètre Klett-Summerson ont été ramenés en densité optique grâce à la courbe suivante :

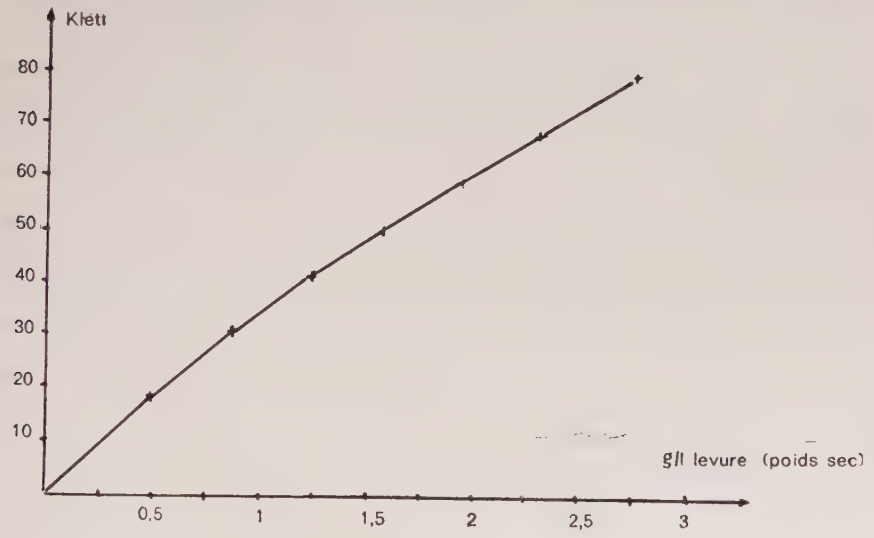


Fig. 1
Etalonnage du colorimètre Klett-Summerson

4. MÉTHODES.

a) *Identification des espèces.*

Nous avons choisi les méthodes taxinomiques de Lodder (1951) avec quelques variantes.

i) L'étude morphologique est faite sur le milieu de Wickerham (1951) (Yeast Morphology Agar Difco) en suivant les méthodes de Lodder (1951).

ii) L'étude de la fermentation des glucides est conduite en suivant la mé-

thode de Durham avec les mêmes sucres que Lodder (1951) : glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose en solution de 2 % et raffinose en solution de 4 %. Pour éviter toute confusion sur l'appréciation de la fermentation du raffinose, nous avons réalisé, aussi, systématiquement la fermentation du mélibiose en solution à 2 %.

iii) L'étude de l'assimilation des glucides a été effectuée d'après la méthode de Wickerham (1951), qui est, en fin de compte, très proche de celle de Lodder (1950).

b) *Isolement de cellules* pour cultures monocellulaires ou monospores. Nous avons essayé plusieurs méthodes de micromanipulation. Nous avons finalement opté pour la méthode de la goutte pendante, avec microscope à statif inversé (voir figure 2). C'est une technique très rapide et sûre : le micro-outil ne peut être brisé accidentellement. La cellule choisie, aspirée dans une micropipette obtenue par filage à distance, dont la lumière est comprise entre 5 et 10 µ, est déposée ensuite dans une goutte stérile. Cette goutte est alors aspirée par un morceau de buvard stérile, qui est ensuite plongé lui-même dans le milieu nutritif.

Une croissance a été obtenue par cette méthode dans 501 des cas. Les chances de contamination sont minimes étant donné que la goutte est protégée par la lame de verre qui la soutient, et que le travail d'isolement est très rapide (1 à 2 minutes).

c) *Contrôle de contamination.*

Il se fait par la méthode de numération différentielle, par dilution dans deux séries de boîtes de Petri. La première série contient le milieu de Green et Gray sans actidione (WLN) et donne le nombre total de microorganis-

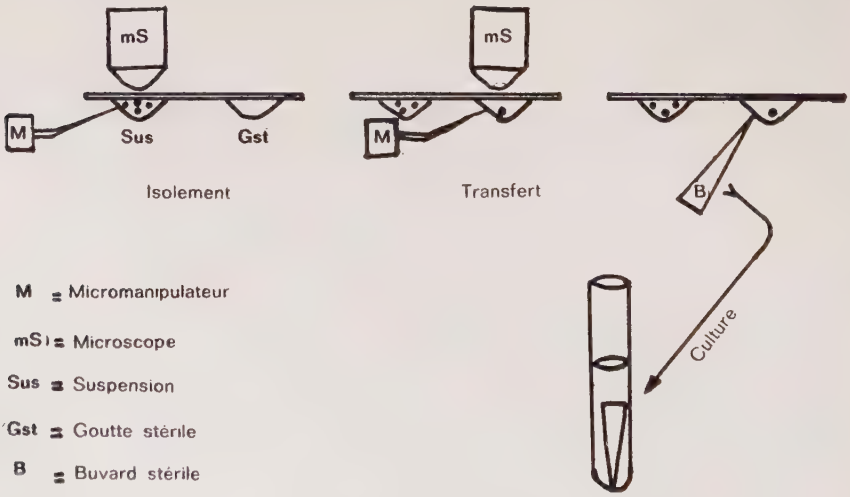


Fig. 2
Isolement d'une cellule

mes par ml. La deuxième série contient le milieu à l'actidione (WLD) qui inhibe la croissance des levures domestiques et qui donne, par conséquent, le nombre total de contaminants (levures sauvages et autres microorganismes). Dans tous les contrôles que nous avons effectués, aucune contamination n'a pu être détectée (moins de 1 contaminant pour 10^7 levures).

d) *Etude de la croissance des levures sur milieu déficient en vitamines.*

Milieu de base ..... Vitamin Free Xeast Base (IB2c)
Ensemencement ..... 10 mg/l
Température ..... 25° C.
Vitamines ajoutées :

Inositol	2 mg/l
Pantothénate de calcium ...	0,2 mg/l
Biotine	2 mg/l
Thiamine	0,2 mg/l
Pyridoxine	0,2 mg/l
Nicotinamide	0,2 mg/l

Nous utilisons sept séries de tubes. Dans la première, qui sert de référence, toutes les vitamines sont présentes. Dans chacune des autres, une vitamine manque, différente pour chaque série. Les séries sont caractérisées par les abréviations suivantes :

TABLEAU I

Abréviations utilisées

N°	Abréviations	Vitamine manquante
1	Auc.	Aucune ne manque
2	Biot.	Biotine
3	Inos.	Inositol
4	Ca Pa	Pantothénate de calcium
5	Pyri.	Pyridoxine
6	Thia.	Thiamine
7	Niac.	Nicotinamide

Les tubes sont ensemencés avec les levures. Ils sont placés en étuve pendant 48 heures à 25° C. Leur contenu est transvasé dans la cuve du photomètre et les résultats sont enregistrés.

C) RESULTATS ET DISCUSSION

1. CONTRÔLE DES SOUCHES.

a) *Saccharomyces Calsbergensis* PY 74

i) *Morphologie :*

Cellules en majorité ovales, quelques unes rondes, de dimensions (5-8μ) x (5-10μ). Au bout de deux jours, un sédiment se forme au fond du tube. Les colonies sur milieu solide sont de couleur crème, mates à légèrement brillantes.

ii) *Fermentation et assimilation des sucres.*

TABLEAU II

Sucres	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	+	
Raffinose	+ (3/3)	

Les caractères ci-dessus confirment qu'il s'agit bien d'une souche de *Saccharomyces Carlsbergensis.*

b) *Saccharomyces Carlsbergensis* PY 76

i) *Morphologie :*

Les cellules sont en majorité rondes, quelques-unes ovales, de dimensions (6-10μ) x (6-12μ). Dès 36 heures, un sédiment se forme au fond du tube. (Cette souche est caractérisée par une floculation très forte). Les colonies sont de couleur crème et toujours mates.

ii) *Fermentation et assimilation des sucres.*

TABLEAU III

Sucres	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	+	
Raffinose	+ (3/3)	

Les caractères ci-dessus confirment qu'il s'agit bien d'une souche de *Saccharomyces Carlsbergensis.*

c) *Saccharomyces Carlsbergensis* B 101

i) *Morphologie :*

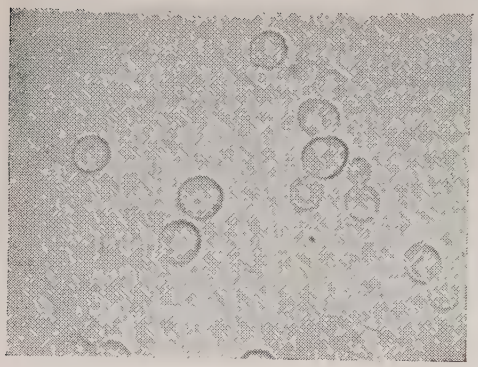
Les cellules sont en majorité sphériques, rarement ovales, de dimensions (5-9μ) x (5-12μ). Au bout de trois jours, un sédiment est formé au fond du tube. Les colonies sont de couleur crème-pâle, légèrement brillantes.

ii) *Fermentation et assimilation des sucres.*

TABLEAU IV

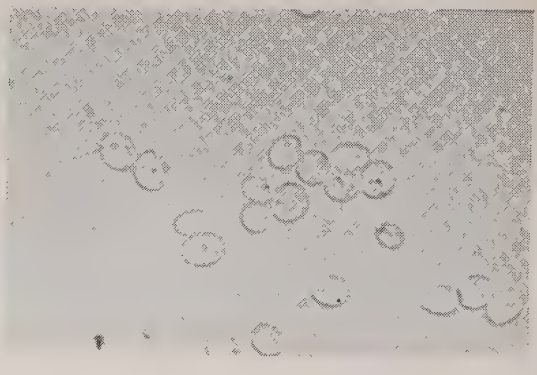
Sucres	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	+	
Raffinose	+ (3/3)	

Les caractères ci-dessus confirment qu'il s'agit bien d'une souche de *Saccharomyces Carlsbergensis.*



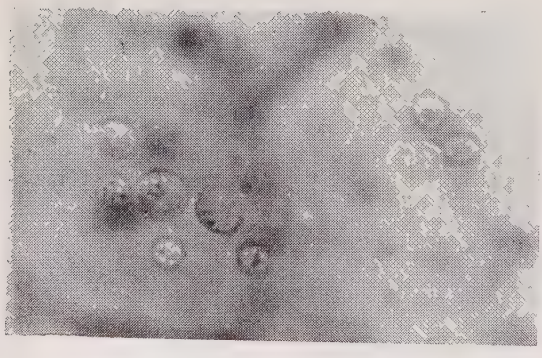
1

S. Carlsbergensis PY 76



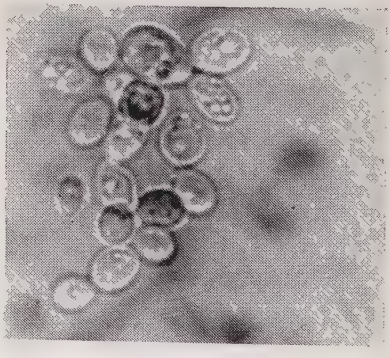
2

S. Carlsbergensis PY 74



3

S. Carlsbergensis B 101



4

S. Logos B 106

Photographies de divers *Saccharomyces* en culture sur gélose au malt au bout de huit jours

d) *Saccharomyces Uvarum* CLVUC

i) *Morphologie :*

Les cellules sont en général allongées, parfois ovales. Leurs dimensions sont de (2-5μ) x (5-20μ). Le rapport longueur/largeur est, en général, supérieur à 2. La culture en milieu liquide montre un sédiment au bout de trois jours et un anneau au bout d'un mois à 17° C. Les colonies sont plates, brillantes, de couleur crème quand elles sont jeunes. Plus tard, elles tournent au brun. Les bords en sont lobés. Elles forment un pseudo-mycelium. Nous avons obtenu des spores en petit nombre sur milieu gelosé de Gorodkowa au bout de quatre semaines. Elles sont rondes ou ovales.

ii) *Fermentation et assimilation des sucres.*

TABLEAU V

Sucres	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	+	
Raffinose	+ (3/3)	

Les caractères ci-dessus confirment qu'il s'agit bien d'une souche de *Saccharomyces Uvarum.*

e) *Saccharomyces Logos* B 106

i) *Morphologie :*

Les cellules sont rondes, ovales, ou allongées, et très grosses, comparativement aux cellules des autres espèces étudiées jusqu'ici. Elles mesurent (4-7μ) x (8-20μ). Au bout de trois jours dans de l'extrait de Malt, elles forment un sédiment. Au bout d'un mois à 17° C., elles forment un anneau. Les colonies sont brillantes, de couleur crème. Les bords deviennent frangés. En milieu pauvre, on observe un pseudomycelium bien développé. On obtient des spores au bout de trois semaines sur des blocs de plâtre. Elles sont rondes en général.

ii) *Fermentation et assimilation des sucres.*

TABLEAU VI

Sucres	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	—	
Raffinose	+ (3/3)	

Les caractères ci-dessus confirment qu'il s'agit bien d'une souche de *Saccharomyces logos.*

f) *Saccharomyces Cerevisiae* B 169

i) *Morphologie :*

Les cellules sont rondes parfois, mais surtout ovales. Elles mesurent (4-8μ) x (4-10μ). Au bout de trois jours, un sédiment est formé. Les colonies sont de couleur crème, mates ou très légèrement brillantes.

ii) *Fermentation et assimilation des sucres.*

TABLEAU VII

Sucres	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	—	
Raffinose	+ 1/3	

Les caractères ci-dessus confirment qu'il s'agit bien d'une souche de *Saccharomyces Cerevisiae.*

2. Exigences en vitamines des différentes souches étudiées.

Les premières expériences ont été effectuées sur les souches PY 76 et PY 74 dans les laboratoires de recherche de la Falstaff Brewing Corporation, d'après la méthode de Schults et Atkin (1947). Dans les conditions fixées par cette méthode, nous aboutissons aux conclusions suivantes (Fig. 3) : (PY 74 exige pour sa croissance la biotine et l'inositol, alors que PY 76 n'exige que la biotine).

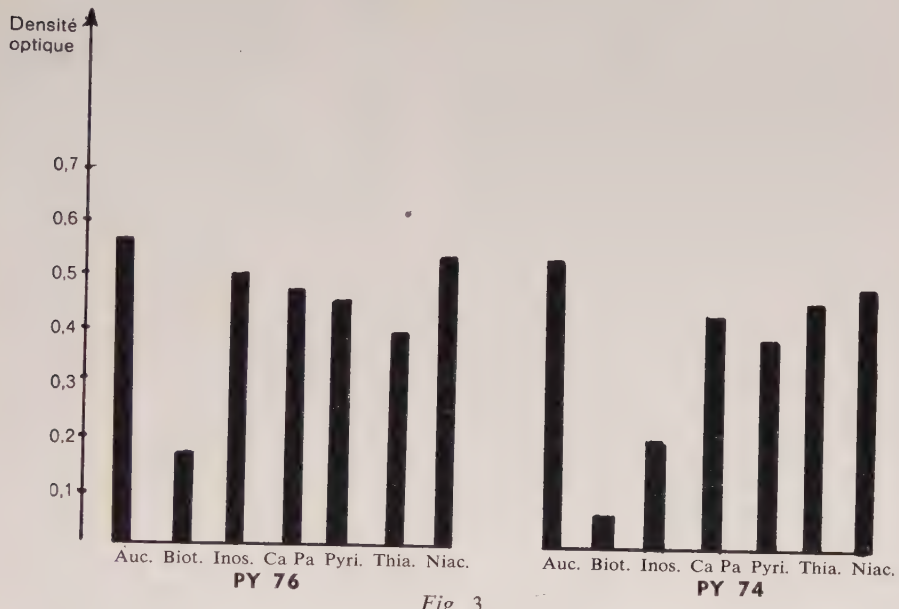


Fig. 3
Biogrammes des souches PY 74 et FY 76 de *Saccharomyces Carlsbergensis* (Méthode de Schultz et Atkin) au bout de 48 heures

Des expériences furent refaites ultérieurement en tenant compte de recommandations de Kirsop (1955). Nous avons, alors, suivi la méthode de Amaha et Takeushi (1958). Les résultats obtenus (Fig. 4) nous montrent que l'exigence en inositol de PY 74 est adaptative et que seule l'exigence en biotine est absolue. En revanche, il semble que l'exigence en biotine de PY 76 soit adaptative.

Pour les autres souches, nous n'avons plus suivi qu'uniquement la méthode de Amaha et Takeushi, puisqu'elle donne des résultats nettement plus complets. Les conclusions sont portées sur les figures 5, 6, 7, 8, 9 et resumées dans le tableau 8.

Nos résultats sont interprétés selon le système suivant, tel qu'il a été proposé par Kirsop :

a) *Pas d'exigence :*

La croissance maximale est la même dans le milieu déficient que dans le milieu complet (à la marge d'erreur près).

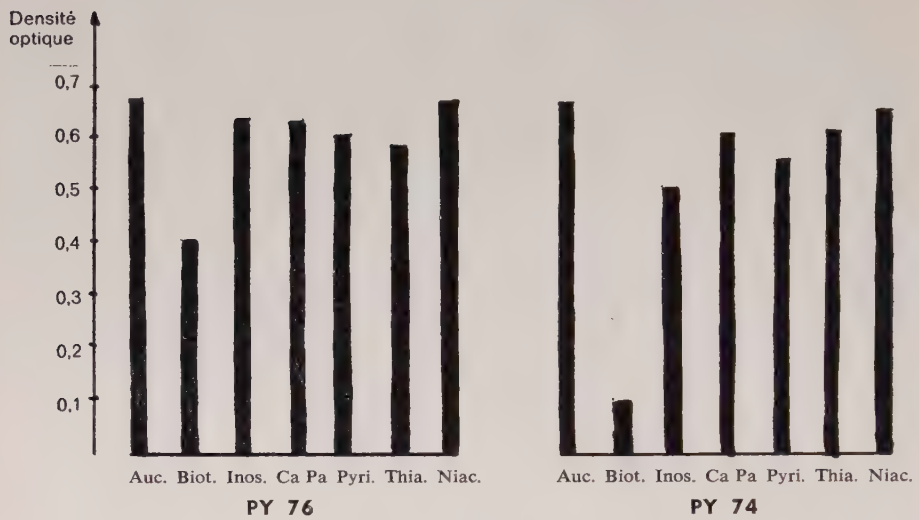


Fig. 4

Biogrammes des souches PY 74 et PY 76 de *S. Carlsbergensis* (Méthode de Amaha et Takeushi) au bout de 7 jours

b) *Exigence partielle :*

La levure pousse plus lentement et atteint un maximum nettement plus bas et que celui du milieu complet.

c) *Exigence adaptative :*

La levure pousse très lentement pendant 1 à 3 jours et ensuite se développe normalement.

d) *Exigence absolue :*

Croissance très faible ou inexistante (moins d'un tiers de la turbidité obtenue en milieu complet). Les résultats peuvent être résumés sur un diagramme tel que ceux de la figure 14. En trait plein, on représente la croissance au bout de 48 heures, et en trait hachuré au bout de 7 jours. Ces diagrammes permettent de voir directement de quel genre d'exigence il s'agit. Ils montrent, à la fois, les résultats de la méthode de Schultz et Atkin et de celle de Amaha et Takeushi. On peut voir que dans la plupart des cas la caractérisation des souches est satisfaisante. Cependant, pour l'exigence en biotine de *Saccharomyces Carlsbergensis* PY 76 et de *Saccharomyces Logos* B 106, on voit qu'il existe un doute. Dans ces deux cas, la limite entre l'exigence absolue et l'exigence adaptative n'est pas clairement déterminée. Ce phenomène sera approfondi au cours de notre troisième chapître.

Les différents types d'exigences pour chaque souche sont portés sur le tableau VIII.

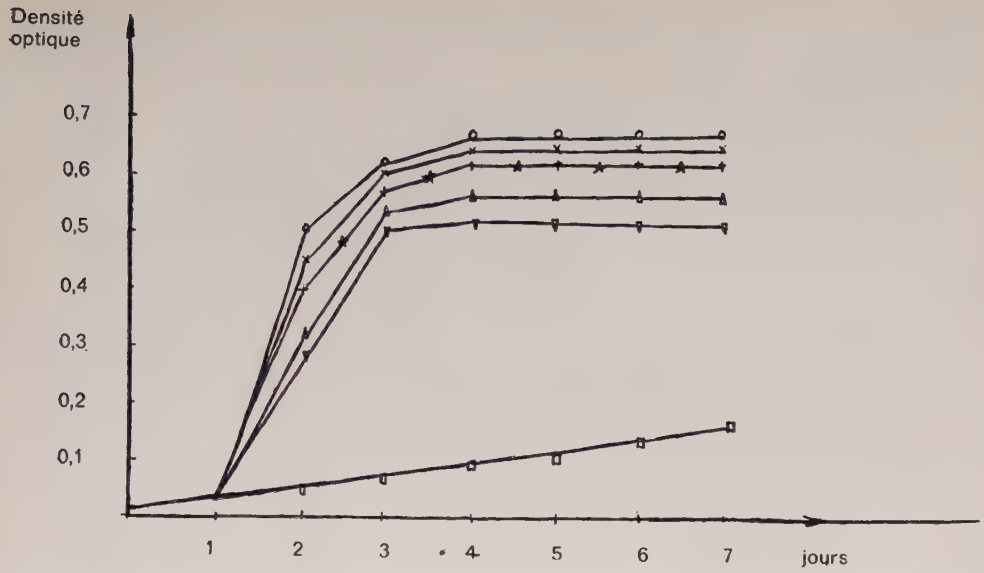


Fig. 5.

Croissance de *Saccharomyces Carlsbergensis* B 101
en l'absence de vitamines

o Milieu complet
× Inositol absent
\+ Pyridoxine absente
★ Nicotinamide
Δ Pantothénate absent
▽ Thiamine absente
□ Biotine absente

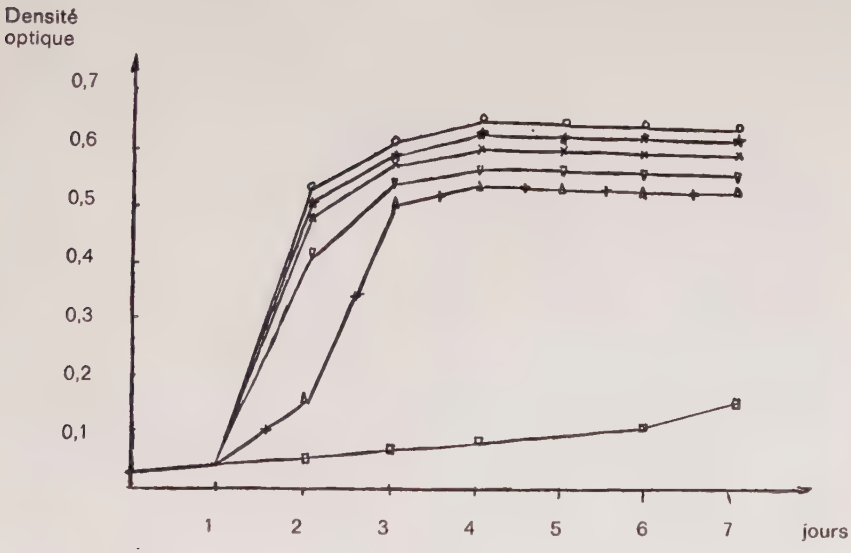


Fig. 6.

Croissance de *Saccharomyces Uvarum* CLVUC
en l'absence de vitamines

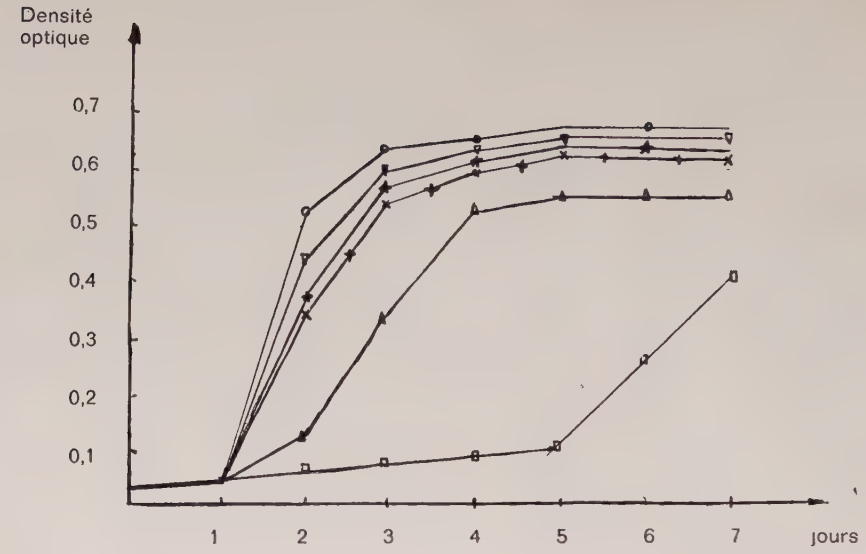


Fig. 7.

Croissance de *Saccharomyces Logos* B 106
en l'absence de vitamines

o Milieu complet
× Inositol absent
+ Pyridoxine absente
★ Nicotinamide
Δ Pantothénate absent
∇ Thiamine absente
□ Biotine absente

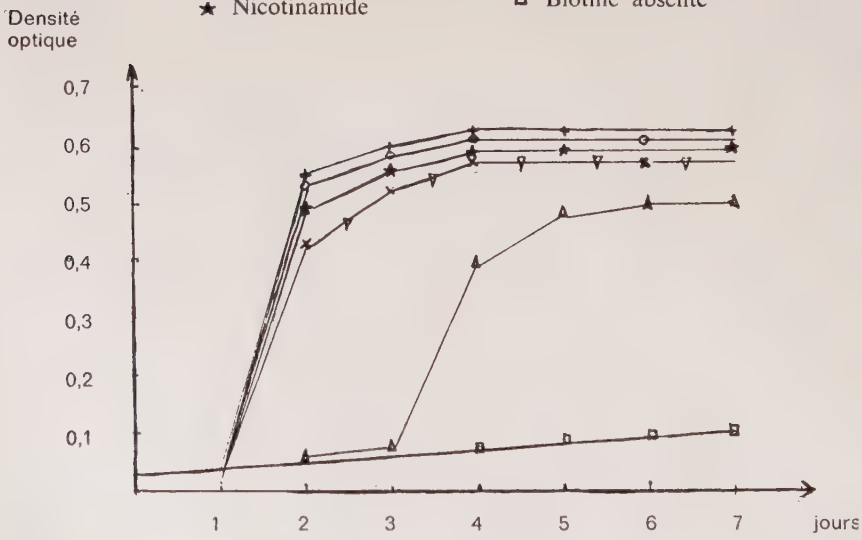
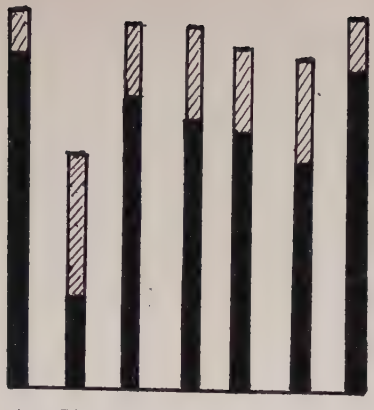
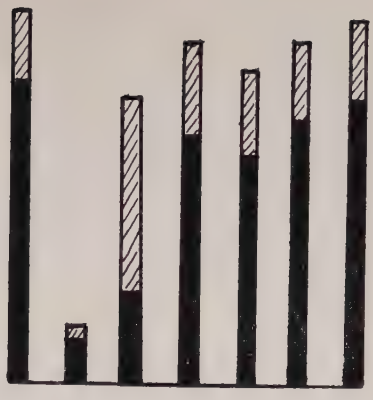


Fig. 8.

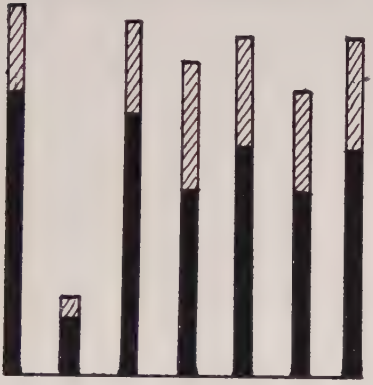
Croissance de *Saccharomyces Cerevisiae* B 169
en l'absence de vitamines



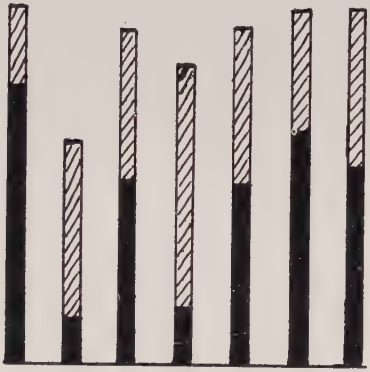
Saccharomyces Carlsbergensis PY 76



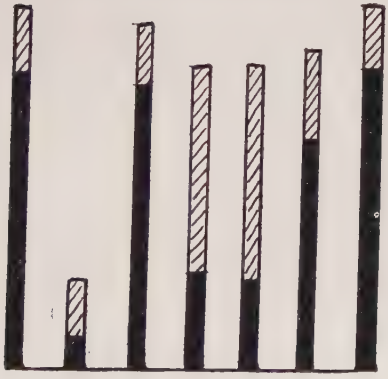
Saccharomyces Carlsbergensis PY 74



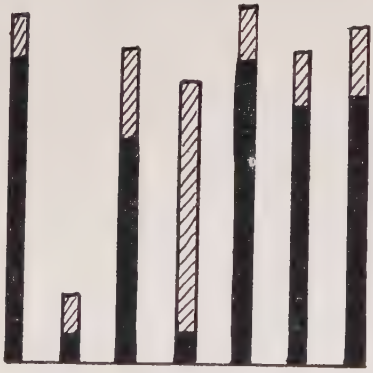
Saccharomyces Carlsbergensis B 101



Saccharomyces Logos B 106



Saccharomyces Uvarum CLVUC



Saccharomyces Cerevisiae B 169

Fig. 9.

Biogrammes de 6 souches de *Saccharomyces*

Croissance au bout de ■ 2 jours

▨ 7 jours

D) *CONCLUSION*

TABLEAU 8

Exigences en vitamines des différentes souches étudiées

Vitamines \ Souches	*S. Carls.* PY 74	*S. Carls.* PY 76	*S. Carls.* B 101	*S. Uvar.* CLVUC	*S. Logos* B 106	*S. Cerev.* B 169
Biotine	Absolue	Adaptative	Absolue	Absolue	Adaptative	Absolue
Inositol	Adaptative	Partielle	Nulle	Nulle	Partielle	Partielle
Pantothénate	Partielle	Partielle	Partielle	Adaptative	Adaptative	Adaptative
Pyridoxine	Partielle	Partielle	Partielle	Adaptative	Partielle	Nulle
Thiamine	Partielle	Partielle	Partielle	Partielle	Nulle	Partielle
Nicotinamide	Nulle	Nulle	Partielle	Nulle	Partielle	Nulle

CHAPITRE III

CROISSANCE DE QUELQUES *SACCHAROMYCES* DANS UN MILIEU AVITAMINE

A) Introduction

B) Matériel et méthodes

1) *Souches ;*
2) *Milieux ;*
3) *Instruments ;*
4) *Méthodes.*

C) Résultats et discussion

1) *Résultats ;*
2) *Discussion.*

D) Conclusion *: Valeur et limites*

A) *INTRODUCTION*

Dans toutes les souches examinées précédemment, nous avons vu que seule la biotine est exigée d'une façon absolue et pour quelques souches, nous avons même pu émettre des doutes sur cette exigence. Nous devons donc logiquement poser la question de savoir si les levures ne pourraient pas croître dans un milieu absolument dépourvu de vitamines. Ainsi, il semble que si l'exigence en biotine est adaptative, il y aura une croissance normale dans un milieu avitaminé au bout d'une certaine période. Au contraire, si l'exigence en biotine est absolue, la croissance sera nulle ou très faible.

B) *MATERIEL ET METHODES*

1) Souches : voir II B 1

2) Milieux :

a) *Milieu synthétique avitaminé de Wickerham* (Vitamin Free Yeast Base Difco).

b) *Milieu synthétique minéral* (G. N.)

— Glucose	10	g/l.
— Sulfate d'ammonium	5	g/l.
— Phosphate de potasium monobasique	1	g/l.
— Sulfate de magnésium	0,5	g/l.
— Chlorure de sodium	0,1	g/l.
— Chlorure de calcium	0,1	g/l.

3) Instruments (Cf. 1 B 3) avec en plus :

a) *Biophotomètre de Bonet-Maury.*

Cet instrument rend les plus grands services, car il enregistre simultanément les croissances de 6 différentes souches. Malheureusement il n'est pas muni d'un système de refroidissement, qui permettrait de l'utiliser à des températures relativement basses. Nous n'avons pu nous en servir au-dessous de 32° C., ce qui pour les levures limite singulièrement ses possibilités.

b) *Electrophotomètre de Meunier.*

Pour les températures courantes de croissance des levures, nous avons dû employer une étuve à 25° C. et faire les mesures en discontinu à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier. C'est un appareil précis et très utile pour les levures flocculantes, grâce à ses cuves horizontales.

4) Méthodes (Cf. 1 B 4).

Les mesures données par le Biophotomètre de Bonet-Maury sont relatives. Elles ont été transformées en densité optique par la méthode suivante :

a) Le biophotomètre de Bonet-Maury a été mis au zéro par rapport à l'eau distillée.

b) Différentes concentrations de levures ont été mesurées dans l'instrument et on a calculé les densités optiques correspondant à ces concentrations à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier. On obtient la courbe suivante :

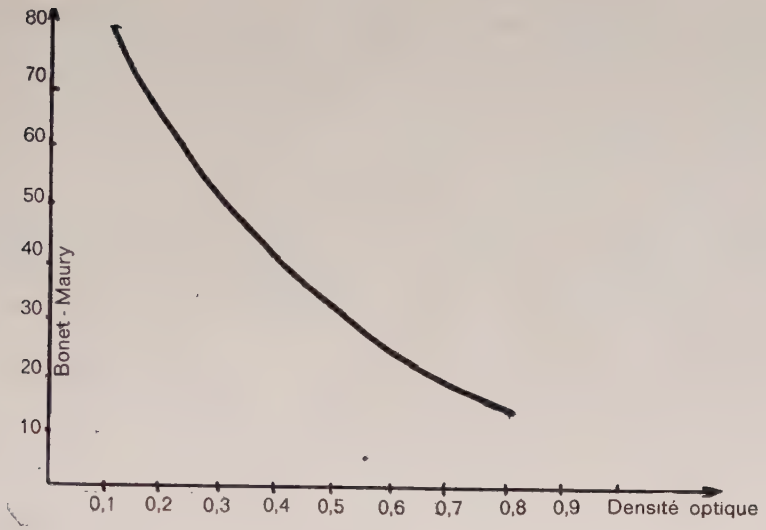


Fig. 10
Etalonnage du Biophotomètre de Bonet-Maury

C) *RESULTATS ET DISCUSSION*

1) Milieu de wickerham.

Ensemencement. — Nous avons conservé la technique de l'ensemencement faible pour éviter que les réserves de vitamines accumulées par les cellules n'interfèrent avec les résultats. Nous avons pris la même concentration que dans les expériences précédentes, à savoir 10 mg/litre de levure humide, soit approximativement 3 mg/litre de levure sèche. (On admet généralement que la levure humide renferme 1/4 à 1/3 de matières sèches).

Température. — L'influence de la température a été étudiée très sommairement : nous avons effectué les expériences à deux températures différentes : 25° C et 32° C. Les résultats obtenus sont portés sur les figures 15 et 16.

a) *Saccharomyces Carlsbergensis* PY 76

Après une phase latence de quatre jours, la croissance augmente régulièrement jusqu'au 9e jour. Ensuite, elle n'augmente que faiblement et par à-coups. On obtient une courbe en escalier, ou dents de scie. Ce phénomène est encore plus accentué en milieu minéral et il fera l'objet d'un paragraphe spécial, II C 2.

b) *Saccharomyces Carlsbergensis* B 101.

Pour cette souche, la phase de latence est très longue : elle atteint 12

jours. Ensuite, la croissance prend un rythme très lent qui a tendance à s'accélérer avec le temps. Au bout d'un mois, la concentration de levure est égale aux deux tiers de la concentration obtenue dans un milieu vitaminé. Au bout de deux mois, on peut obtenir des variants qui fabriquent des pigments rouges (voir chapitre V).

c) *Saccharomyces Uvarum* CLVUC.

Après une phase de latence de 6 jours, la croissance prend un rythme très rapide jusqu'au 12e jour, puis la croissance se fait par paliers jusqu'au 22e jour, après quoi, elle cesse complètement.

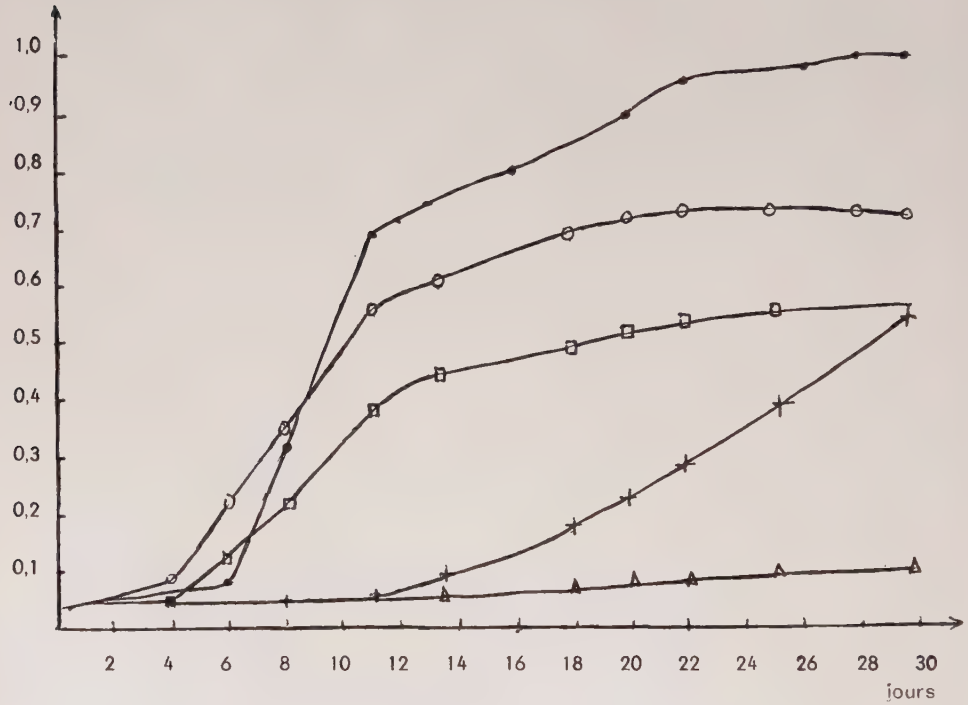


Fig. 11.

Croissance en milieu avitaminé
25° C [E] = 10 mg/l

- ● *Saccharomyces Uvarum* CLVUC
- ○ *S. Carlsbergensis* PY 76
- □ *S. Logos* B 104
- \+ *S. Carlsbergensis* B 101
- Δ *S. Cerevisiae* B 169

d) *Saccharomyces Logos.*

Après une phase de latence de 4 jours, la croissance prend un rythme

assez rapide jusqu'au 13e jour, puis augmente par paliers successifs jusqu'au 25e jour. La population est alors stabilisée.

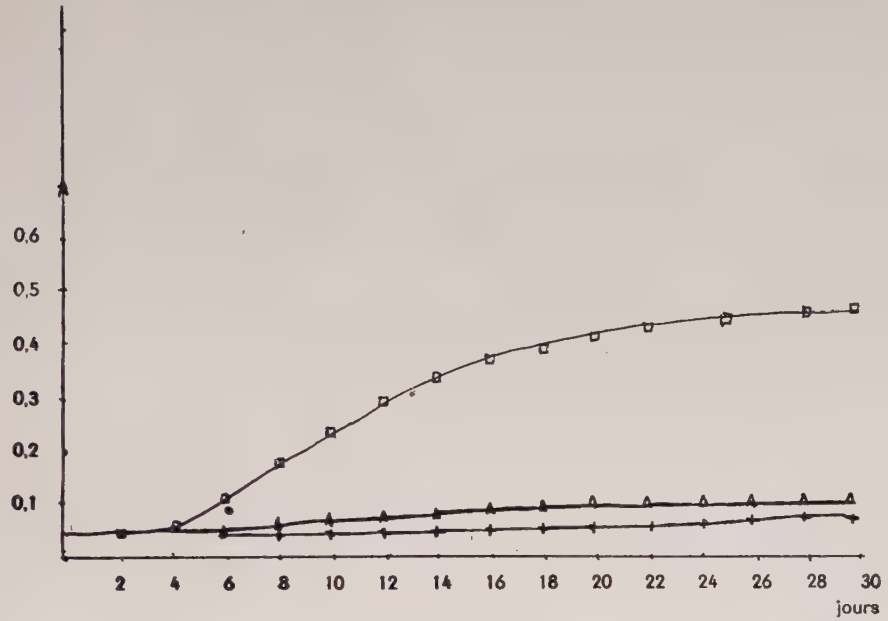


Fig. 12.

Croissance en milieu avitaminé
32° C [E] = 10 mg/l

□ *Saccharomyces Logos* B 106
Δ *S. Cerevisiae* B 169
\+ *S. Carlsbergensis* B 101
et autres souches

e) *Saccharomyces Cerevisiae.*

La croissance a été tellement lente qu'elle peut être considérée comme nulle.

A 32° C., seul *Saccharomyces Logos* est capable de croître de façon substantielle dans un milieu avitaminé. A cette température, la phase de latence est même pratiquement supprimée, ce qui est parfaitement normal du point de vue cinétique. A 12° C., aucune croissance n'est décelable au bout d'un mois.

2) Milieu minéral synthétique.

Dans ce milieu, nous ne rapporterons que les résultats obtenus sur la souche PY 76, à cause de la particularité de la courbe en escalier (Fig. 17). Sur cette figure, nous avons porté la croissance en densité optique et la proportion d'alcool éthylique présente dans le milieu. Les deux courbes sont en dents de scie. Mais à chaque minimum de l'une,

correspond un maximum de l'autre et vice-versa. On peut donc supposer que la croissance des levures se fait en phases successives selon le scénario suivant :

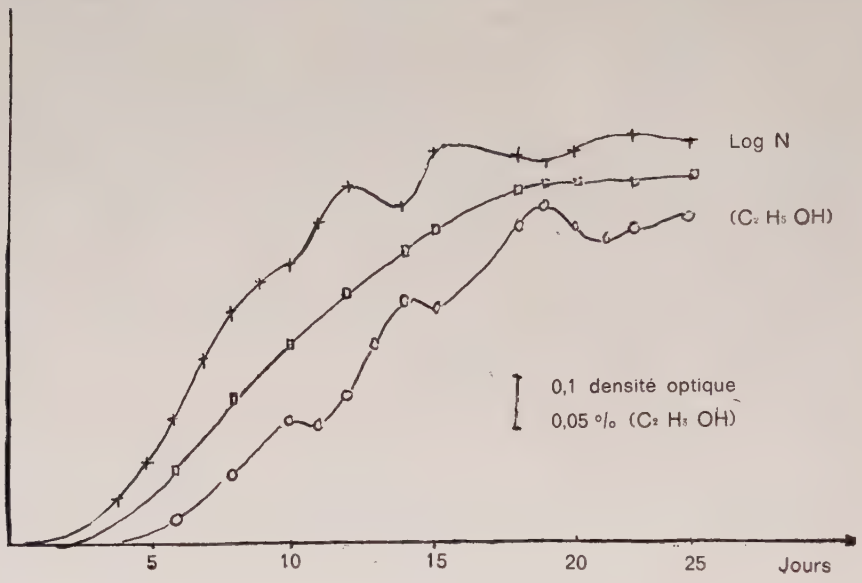


Fig. 13

Croissance en Milieu minéral
Saccharomyces Carlsbergensis PY 76
25° C E = 10 mg/l
+ Croissance (Log N) ;
O Concentration en éthanol
Log N + Ki $C_2H_5OH = K_2$ f (t)
Kl = 1
K_2 = 2, f (t) = sigmoïde

Il y a d'abord, correspondant à la période 1 - 10 jours, formation de cellules de levure et fermentation alcoolique concomitantes, puis à 10-11 jours, assimilation d'une partie de l'éthanol produit, de 11 à 14 jours autolyse des cellules avec production d'alcool, et succession alternative des deux dernières phases. Si l'on trace la courbe :

Log N + R C = F (t) où
N = nombre de cellules
C = concentration en éthanol
t = temps
R = constance prise arbitrairement égale à 1,

on obtient une courbe sigmoïdale. On peut également expliquer ce phénomène en formulant une autre hypothèse, relative à la croissance des cellules. Au moment de la sporulation, plusieurs ségrégants, génétiquement distincts, se sont formés. Leurs différences se manifestent dans le milieu GN par des phases de latence plus ou moins longues.

La turbidité mesurée rend compte non pas de la population de chaque phase prise individuellement, mais du nombre total de cellules présentes dans le milieu. Au moment où la croissance de la première population présente un fléchissement, la deuxième prend le départ, et ainsi de suite. Nous expliquons ainsi les accidents de la courbe (Fig. 14). Ceux-ci sont de plus en plus atténués avec le temps parce que le milieu s'appauvrit en sources nutritives.

Les deux explications proposées ne sont pas contradictoires mais plutôt complémentaires. En effet, l'une éclaire le phénomène du point de vue du métabolisme des cellules, l'autre du point de vue génétique.

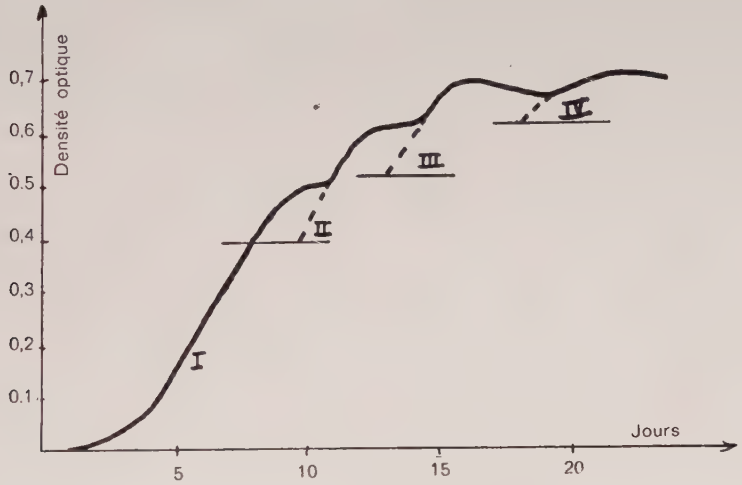


Fig. 14
Croissance en milieu minéral
Sacchharomyces Carlsbergensis PY 76

Cependant, ces résultats sont encore sujets à caution. L'étude d'un tel phénomène devrait faire l'objet de longs développements à lui seul. Des méthodes d'analyse beaucoup plus précises seraient nécessaires.

D) *CONCLUSION*

Contrairement à ce que nous avons supposé au début de ce chapitre, il n'y a pas que les levures qui n'ont pas d'exigences absolues en vitamines qui croissent dans un milieu dévitaminé. En effet, *Saccharomyces Uvarum* et *Saccharomyces Calsbergensis* B 101 présentent une exigence absolue en biotine. Cependant, on réussit à les faire pousser en milieu dévitaminé. Il faut donc conclure qu'un phénomène nouveau. différent de la croissance simple, se superpose à celle-ci ; sa recherche fera l'objet de notre quatrième chapitre.

Chapitre IV

SPORULATION ET DIPLOIDISATION ILLEGITIME EN MILIEU AVITAMINE

A) Introduction.

B) Matériel et méthodes.

1) *Souches ;*

2) *Milieux ;*

3) *Instruments ;*

4) *Méthodes ;*

C) Résultats et discussion.

1) *Résultats ;* 2) *Discussion.*

D) Conclusion *: Valeur et limites.*

A) *INTRODUCTION*

Nous venons de voir au cours du chapitre précédent que certaines levures, malgré leur exigence en biotine, ont la faculté de se multiplier au bout d'un certain temps dans un milieu avitaminé. Ce phénomène avait déjà été entrevu en 1950 par Lodder sur quelques espèces du genre *Saccharomyces*. Elle n'a d'ailleurs pas cherché à l'expliquer. Etant donné les résultats obtenus dans les chapitres précédents, nous pouvons supposer :

— que la levure finit par être capable de s'adapter à la synthèse de la biotine.

— ou que la levure réorganise son métabolisme de façon telle que la biotine ne lui est plus nécessaire. Notons dès maintenant que cette hypothèse est fort improbable, étant donné le rôle fondamental de la biotine dans le métabolisme cellulaire.

— ou enfin, qu'à la suite d'une variation, la capacité de synthétiser la biotine qui était à l'origine présente dans le patrimoine génétique de la levure a été mise à jour par disparition d'un répresseur ou d'un inhibiteur.

Le résultat recherché dans ce chapitre est de savoir laquelle de ces hypothèses est la plus valable.

D'autre part, nous avons pu lire dans la revue bibliographique placée en tête de ce travail que la condition principale de sporulation d'une levure est le passage d'un milieu riche dans un milieu pauvre. Il serait donc normal que le passage du moût de bière à un milieu avitaminé provoquât la sporulation. Miller a pourtant déclaré que le glucose était un inhibiteur de la sporulation. Cependant, le milieu de Gorodkowa contient 10 g par litre de glucose comme seule source de carbone et c'est un milieu qui est excellent comme inducteur de sporulation. Nous avons également pu constater que l'absence de biotine n'inhibait pas du tout la sporulation. Il est alors possible qu'en l'absence de vitamines, le micro-organisme engage une réaction de défense. De toute façon, comme nous allons le voir, nous avons observé des spores dans le milieu de Wickerham, qui est privé de facteurs de croissance.

B) *MATERIEL ET METHODES*

1) Souches : voir II B 1.

2) Milieux : Milieu de Wickerham (Vitamin Free Yeast Base Difco).

3) Instruments : Microphotographie.

a) Pour la souche *Saccharomyces Carlsbergensis* PY 76 microscope Wild équipé avec boîte Polaroïd.

b) Pour les autres souches, Microscope Wild équipé avec boîte Plaubel.

4) Méthodes : Voir II B 4, avec en plus les méthodes de coloration des spores.

a) Méthode à froid de Bartholomew et Mittwer.

— Etaler une petite quantité de levure dans une goutte d'eau sur une lame de verre.

— Laisser sécher et fixer en passant une vingtaine de fois dans une flamme de bec Bunsen.

— Colorer 10 minutes avec une solution aqueuse saturée de vert de Malachite.

— Rincer au robinet pendant 10 secondes.

— Colorer pendant 15 secondes avec une solution aqueuse à 0,25 % de safranine.

— Rincer au robinet et sécher au buvard.

b) Méthode de Dorner et Snyder.

— Faire une suspension très concentrée de levure dans deux ou trois gouttes d'eau distillée.

— Ajouter autant de Carbofushine fraîchement filtrée.

— Mettre au bain-marie pendant 10 minutes.

— Mélanger une anse de la préparation avec une anse de solution aqueuse saturée de nigrosine sur une lame.

— Etaler rapidement en une couche aussi fine que possible et sécher rapidement.

Les spores sont roses et se distinguent du fond noir de nigrosine.

c) Méthodes de Wirtz (pour mémoire).

— Fixer à la flamme.

— Colorer avec une solution aqueuse à 5 % de vert de malachite de 1 à 3 minutes avec quelques chauffages à ébullition.

— Rincer à l'eau.

— Décolorer à l'alcool.

— Laver à l'eau.

— Colorer quelques secondes avec une solution aqueuse à 0,5 % de safranine.

— Laver à l'eau et sécher.

Nous avons préféré la méthode de Bartholomew et Mittwer aux autres méthodes en raison de sa commodité d'emploi et parce que les cellules n'y sont pas déformées par l'ébullition.

Nous avons également employé, aussi, la méthode de Dorner car elle permet de voir avec beaucoup de netteté les ascopores à l'intérieur des asques.

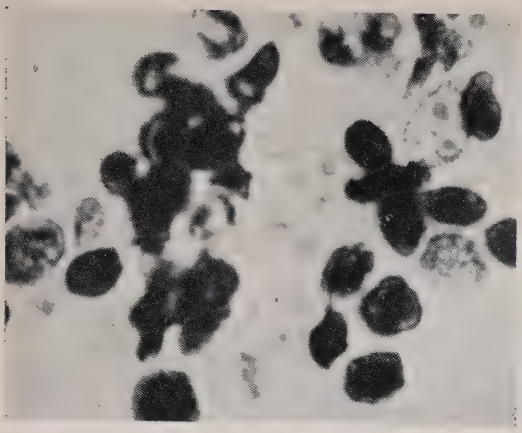
C) *RESULTATS ET DISCUSSION*

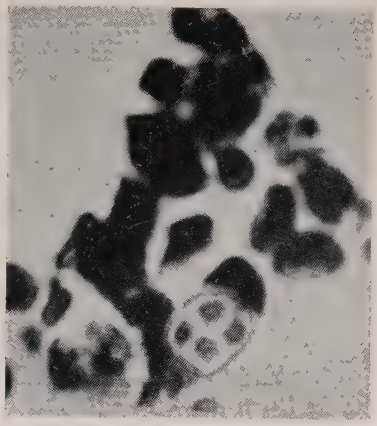
1) Résultats

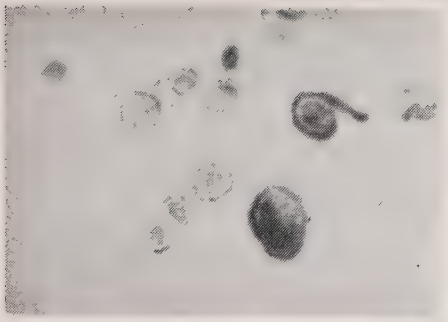
a) *Saccharomyces Carlsbergensis* PY 76

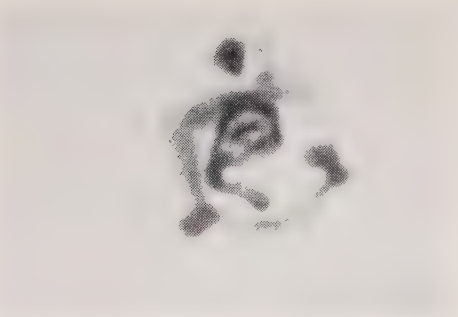
Après un séjour de 24 heures dans le milieu avitaminé de Wickerham, les cellules présentent des anomalies : le cytoplasme devient granuleux ; certains bourgeons sont très fins et s'allongent démesurément. Au bout de 3 jours, les premières asques apparaissent, contenant 1, 2 ou 4 spores. La photographie n° 5 montre même une sorte de zooglée de spores. C'est une asque monstrueuse contenant 16 spores. Avec le temps, certaines spores dégénèrent et les asques arrivent à ne plus contenir qu'une seule spores (Photo n° 8). A l'intérieur de l'asque, les spores développent un tube de copulation. Les parois des asques se déchirent (Photo n° 7). Les tubes de copulation viennent en contact par leur pointe et à cet endroit il se forme une sphère dans laquelle les spores déversent leur contenu.

Les deux spores et la sphère forment un triangle isocèle. C'est une isogamie parfaite.









Saccharomyces Carlsbergensis PY 76

Asques et ascopores en milieu avitaminé (trois jours)
Coloration par la méthode de Dorner-Snyder

A partir de l'œuf, plusieurs cellules bourgeonnent et forment des sortes d'étoiles. Les cellules se détachent difficilement les unes des autres et forment de petits îlots. La prolifération est relativement rapide (voir chapitre précédent). La levure sédimente très rapidement au fond du récipient, sans doute à cause de la formation des îlots précédents. Les cellules qui n'ont pas sporulé s'autolysent.

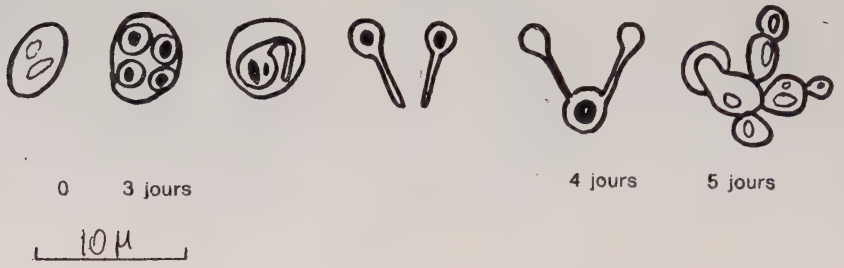


Fig. 15
Passage de *S. Carlsbergensis* PY 76 en milieu avitaminé

b) *Saccharomyces Carlsbergensis* B 101

Le comportement est le même que pour la souche PY 76 avec les différences suivantes : la sporulation est plus lente et les tubes de copulation sont plus courts et plus gros. Nous n'avons pas réussi à observer de diploïdisation. Cependant, nous supposons qu'elle a eu lieu en procédant par analogie étant donné que nous avons vu des spores et qu'au bout d'un certain temps (12 jours) la levure s'est mise à pousser. De toutes façons, nous avons observé à trois reprises, des *œufs* en train de germer.

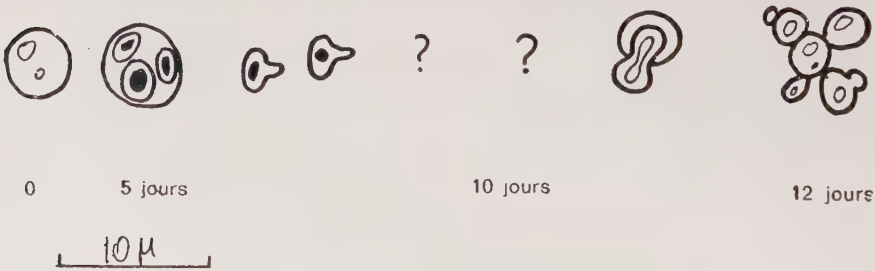


Fig. 16
Passage de S. Carlsbergensis B 101 en milieu avitaminé

c) *Saccharomyces Uvarum*

Plongées en milieu avitaminé, les cellules montrent deux comportements différents. Les unes s'allongent démesurément et atteignent jusqu'à 30 µ. Leur cytoplasme devient granuleux. Les autres ont tendance à

s'arrondir et leur membrane s'épaissit. Au bout de 3 jours, on commence à voir des asques qui contiennent en général 4 spores. La plupart des asques sont sphériques mais d'autres ont une forme de saucisse et l'on voit les 4 spores bien alignées à l'intérieur de l'asque. Les spores sont rondes et émettent un tube de conjugaison relativement important par rapport à la taille de la cellule. La copulation se passe comme pour la souche PY 76, mais parfois, il y a une tendance à l'hétérogamie : une spore se conjuge avec une autre spore plus petite et la sphère dans laquelle leur contenu se déverse se trouve plus près de la petite spore.

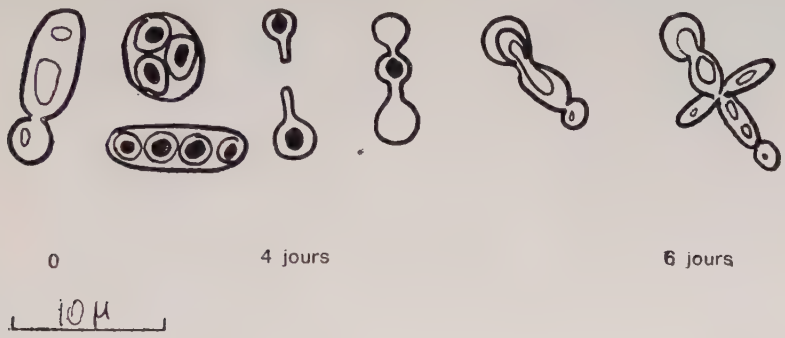
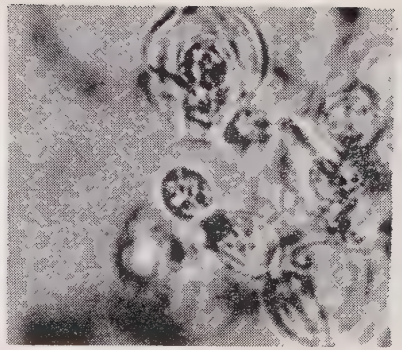


Fig. 17
Passage de *S. Uvarum* CLVUC en milieu avitaminé

d) *Saccharomyces Logos*

Les spores sont très nombreuses. La sporulation atteint 90 % des cellules et on peut les observer au bout de 36 heures. Elles sont au nombre de 2 à 4 par asque, mais souvent, au bout de quelques jours, il n'en reste qu'une. Les tubes de copulation sont, en général, coniques et courts et leur pointe est effilée ; parfois, la spore et son tube ont l'aspect d'une goutte d'eau. La conjugaison est isogamique.

Fig. 18
Passage de *S. Logos* S 104 en milieu avitaminé

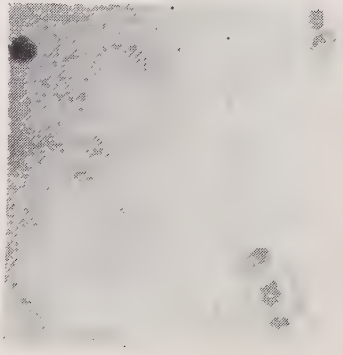


Sporulation

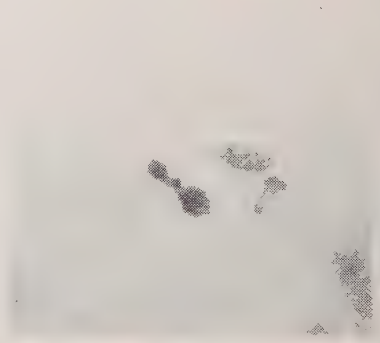
Conjugaison

Germination

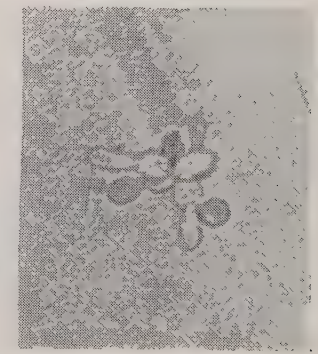
Saccharomyces Logos B 169



Sporulation



Conjugaison



Germination

Saccharomyces Uvarum CLVUC

Milieu avitaminé. Coloration par la méthode de Bartholosov et Mittwer

e) *Saccharomyces Cerevisiae*

Aucune sporulation ne prend place. Les cellules ont tendance à s'autolyser. La croissance est pratiquement nulle.

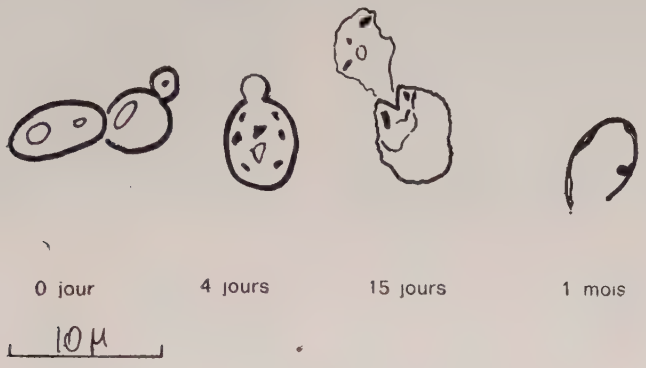


Fig. 19
Passage de *S. Cerevisiae* B 169 en milieu avitaminé

2) Discussion

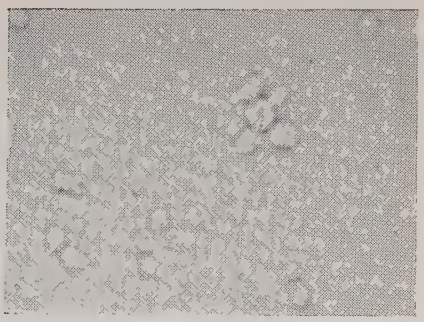
Le nombre de souches étudiées est trop faible pour pouvoir tirer des conclusions générales. Cependant, cette réserve une fois faite, nous constatons que les levures qui sont capables de fermenter le glucose, le saccharose, le maltose et le raffinose complètement, sont aussi capables de se développer dans un milieu avitaminé en sporulant et en se conjugant ensuite. D'autre part, le gain d'un certain caractère, à savoir la possibilité de croître dans un milieu sans biotine (ou la perte de la faculté de synthétiser le répresseur) nous indique qu'il y a eu variation. Etant donné que cette expérience est reproductible et surtout que les phases de latence restent les mêmes, il semble que cette variation soit due non à une mutation mais à une ségrégation. Si cela est vrai, nous avons peut-être affaire au phénomène de diploïdisation illégitime. On peut l'expliquer en utilisant l'hypothèse de Jacob, Monod et Lwoff sur la régulation cellulaire, dont nous allons donner un résumé.

I. *Régulation de l'activité des enzymes : les effets allostériques.*

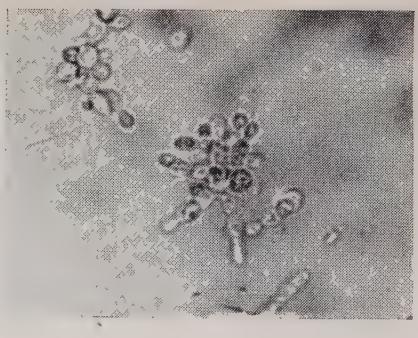
Les effets activateurs ou inhibiteurs dont les systèmes enzymatiques régulateurs font l'objet sont dus à des interactions *indirectes* entre récepteurs stéréospécifiques *distincts* portés par une *même* molécule de protéine enzymatique. C'est ce que Monod *et al.* (1961, 1963) appelle les effets allostériques.

1. Les protéines allostériques sont composées de sous-unités *identiques* (protomères), associées par les liaisons *non covalentes,* et elles possèdent au moins un axe de symétrie.

2. A chaque ligand capable de s'associer spécifiquement avec la protéine correspond un et un seul récepteur par protomère.

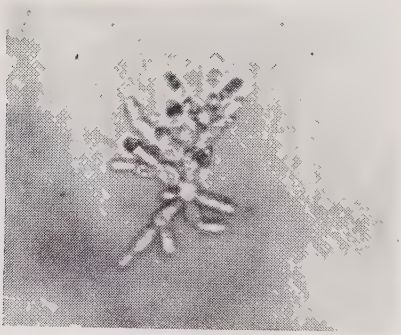


S. Carlsbergensis PY 76 II

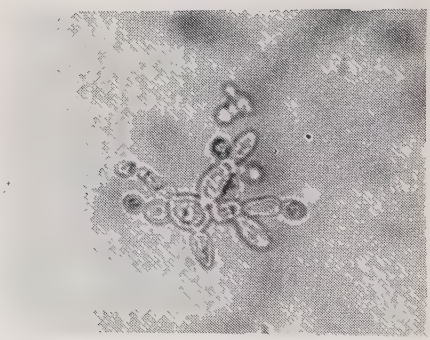


S. Carlsbergensis B 101 II

10 M



S. Uvarum CLVUC II



S. Logos B 106 II

Croissance en étoile en milieu avitaminé après sporulation et conjugaison

3. Ces protéines possèdent au moins deux conformations distinctes et reversibles dans lesquelles la symétrie est toujours conservée.

Exemple : Prenons une protéine allostérique composée de deux protomères et qui est capable d'adopter deux conformations distinctes P et P', toutes deux symétriques, entre lesquelles existe par définition l'équilibre suivant :

$$P\ P \rightleftarrows p'\ p'$$

Supposons que l'état P P possède une affinité pour un substrat S et P' P' pour un effecteur F. On a alors les équilibres suivants :

$$P\ P_S + S \rightleftarrows {}_SP\ P_S$$

$$p'\ p' + F \rightleftarrows p'\ p'_F$$

$$p'\ p'_F + F \rightleftarrows {}_Fp'\ p'_F$$

Dans un tel système l'éffecteur se comporte comme un inhibiteur compétitif du substrat par l'intermédiaire du dimère allostérique. Inversement, un ligand qui présenterait une affinité plus élevée pour l'état P que pour l'état P' serait un activateur du système.

II. *Régulation de la biosynthèse des protéines.*

Devant plusieurs phénomènes (tel que la synthèse de la β-galactosidase qui se fait *uniquement* en présence d'un β-galactoside chez *Escherichia Coli*), on a été obligé d'admettre que l'expression d'un segment génétique déterminant la structure d'une protéine inductible peut être gouvernée par la présence d'un métabolite spécifique.

Monod et Cohn (1952), Monod (1956, 1959) ont prouvé que l'inducteur n'agissait pas en tant que substrat, c'est-à-dire qu'il ne s'associait pas avec l'enzyme lui-même.

De plus la biosynthèse de la plupart des systèmes enzymatiques est réprimée spécifiquement par les métabolites produits de leurs activités. Là encore on a pu démontrer que l'effet régulateur du métabolite n'est pas dû à son action directe avec les protéines dont il gouverne la biosynthèse.

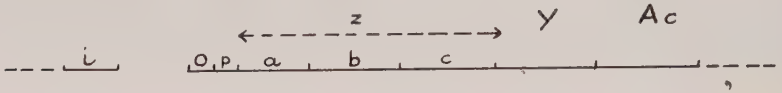
Jacob et Monod (1961, 1963) ont formulé une hypothèse pour l'interprétation générale de ces mécanismes.

1. L'expression d'un gène déterminant la structure d'une protéine peut être inhibée par un constituant macromoléculaire spécifique appelé répresseur.

2. La structure du répresseur est déterminée génétiquement par un gène régulateur.

3. Le répresseur, en plus de son action inhibitrice sur le gène de structure, peut s'associer avec un métabolite, ce qui se traduit soit par une inhibition (système inductible) soit par une activation (système répressible) du répresseur.

4. Plusieurs gènes de structure adjacents peuvent être groupés en une unité d'expression appelée *opéron.* Le répresseur peut empêcher l'activité de l'opéron en inhibant un segment génétique particulier appelé *opérateur.* L'opérateur est localisé à une extrémité de l'opéron. Mais il est distinct des gènes de structure. Il est associé à une *promoteur.* L'ensemble opérateur-promoteur gouverne la transcription en un messager unique des gènes de structure groupés dans l'opéron.



Nous avons représenté ci-dessus la région lactose *d'Escherichia Coli.*

i = gène régulateur
o = opérateur
p = promoteur
Z = gène de structure de la β-galactosidase (représenté avec trois cistrons a, b, c).
Y = gène de structure de la galactoside perméase
Ac = gène de structure de la galactoside transacétylase.

On a isolé des mutants de type i^-, dans lesquelles la propriété inhibitrice du répresseur est abolie. C'est ce que Monod *et al* appellent une *déletion.* La déletion est la disparition d'un ou plusieurs gènes adjacents sur un même chromosome. Elle peut porter sur des longueurs plus ou moins importantes. A notre avis ce qu'on appelle ségrégation est une déletion qui a lieu à l'occasion de l'haploïdisation d'une cellule.

Dans le cas qui nous occupe (Fig. 20), on peut considérer que la sporulation n'est pas directement reliée à la faculté de synthétiser la biotine, (Schéma I), ou au contraire qu'elle entre dans le mécanisme de régulation (Schéma II). Dans les deux cas il s'agit d'un système répressible : la présence de la biotine inhibe le système enzymatique chargé de la biosynthèse de ce métabolite.

Dans le premier cas, on peut supposer que le répresseur agit à la fois sur l'opéron de synthèse de la biotine et sur celui de l'induction de la sporulation. Quand la biotine est absente du milieu, le répresseur est inactif. Les deux opérons se mettent alors à fonctionner indépendamment, ce qui provoque parallèlement la sporulation et la synthèse de la biotine.

Le premier cas est peu vraisemblable, car il est difficile d'imaginer qu'un même répresseur, dont l'action est spécifique, puisse bloquer deux opérateurs différents.

Dans le deuxième cas, on suppose qu'il existe un gène produisant un inhibiteur qui peut agir à deux endroits :

— sur l'opéron de synthèse de la biotine
— ou sur la première enzyme qui en assure la formation.

Ce gène peut disparaître à la suite d'une sporulation qui produit une ségrégation.

Mais cette sporulation est en quelque sorte induite par l'absence de biotine (système répressible). De cette façon, la régulation cellulaire serait

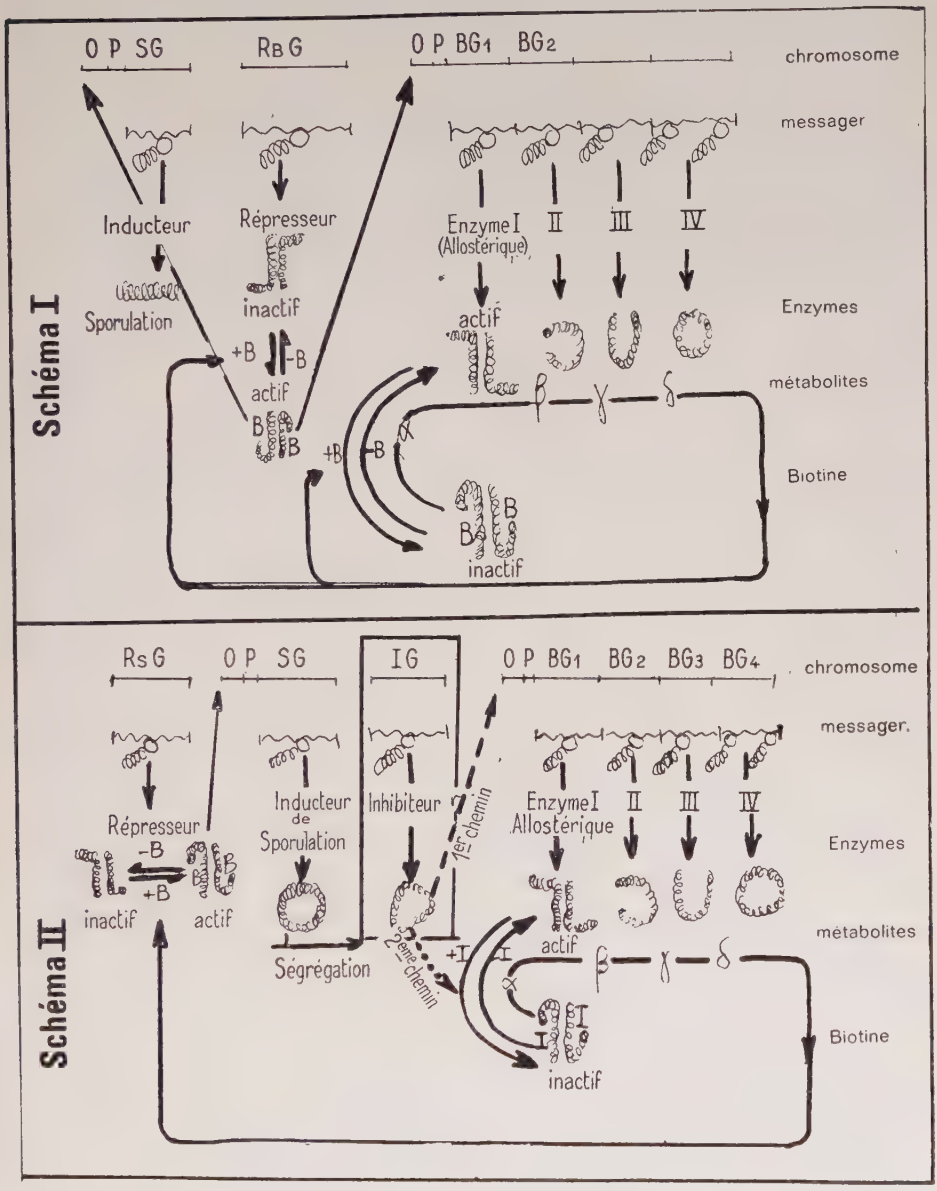


Fig. 20

Induction de la sporulation et synthèse de la biotine

indirecte. Par cela nous voulons dire que le métabolite final, au lieu d'agir sur l'opéron qui préside à sa synthèse, bloque l'opérateur d'un gène inducteur de sporulation. Cela ne veut pas dire que la biotine doit être nécessairement absente d'un milieu pour que la sporulation ait lieu, car on sait qu'il existe de nombreux inducteurs de sporulation.

Cette dernière hypothèse nous paraît la plus vraisemblable pour interpréter les phénomènes que nous avons pu observer.

Symboles utilisés dans la figure 20 *:*

o : opérateur ; *p* : promoteur ; *SG* : gène contrôlant la production d'un inducteur de sporulation ; *RbC* : gène répresseur de la production de biotine ; *RsC* : gène répresseur de la sporulation ; *IC* : gène contrôlant la production d'un inhibiteur ; BC_1, BC_2, *etc...* : gènes liés dans un même opéron, assurant la synthèse de la biotine ; α β γ δ : métabolites intermédiaires ; *B* : biotine, métabolite final ; *I* : inhibiteur.

D) *CONCLUSION*

Les levures que nous avons étudiées croissent en milieu avitaminé après sporulation, ségrégation et diploïdisation illégitime. Cette succession de phénomènes peut être la conséquence de la régulation cellulaire selon l'hypothèse générale de Jacob et Monod. En tout cas, certains gènes ont été modifiés. Il est donc logique d'étudier ces levures après passage en milieu avitaminé car les ségrégations atteignent souvent plusieurs gènes à la fois.

D'autre part, nous devons vérifier si les conjugaisons que nous avons pu voir au microscope sont la règle générale et si la levure qui pousse en milieu avitaminé est bien diploïde. Pour cela, nous allons la soumettre à la sporulation. Nous pouvons obtenir, également, des indications sur la légitimité du diploïde selon sa fertilité.

Cette étude taxinomique fera l'objet de notre cinquième chapitre.

CHAPITRE V

ETUDE DES ESPECES OBTENUES

A) Introduction

B) Matériel et méthodes

1) *Souches ;*
2) *Milieux ;*
3) *Instruments ;*
4) *Méthodes.*

C) Résultats et discussion

D) Conclusion générale

A) *INTRODUCTION*

Au début de ce chapitre, il convient d'indiquer que nous avons trouvé des différences physiologiques entre les souches examinées avant, puis après leur passage en milieu avitaminé. Elles sont tellement importantes qu'elles intéressent les caractères retenus dans la taxinomie. Par exemple, *Saccharomyces Uvarum* après culture en milieu sans facteurs de croissance, ne fermente plus le mélibiose. Ses spores ne sont plus viables. Sagit-il d'une nouvelle espèce ou du moins est-ce que la perte de la faculté de fermenter la mélibiose nous permet-elle de reclasser cette souche dans l'espèce *Saccharomyces Willianus ?* Par prudence, et pour ne pas compliquer la tâche des taxinomistes, nous allons différencier les souches avant et après leur passage en milieu avitaminé par les appellations I et II. De tels cas de conscience se sont posés pour d'autres auteurs. Par exemple, Lindegren a été jusqu'à déclarer que des genres tels que *Torulopsis* ne sont pas des genres valides puisqu'à ses yeux, ils ne représentent que la phase haploïde de certains *Saccharomyces.* Lodder critique ce point de vue peut-être pour des raisons purement pratiques de taxinomie : la

tâche d'organiser les espèces deviendrait effroyablement compliquée. Pourtant, elle va quand même jusqu'à déclarer que telle espèce de *Candida* est la « forme imparfaite d'un *Saccharomyces,* notamment *Candida pseudo-tropicalis* pour *Saccharomyces fragilis* ». On sent le désir latent sinon exprimé, dans la littérature contemporaine, d'une expression plus mathématique de la taxinomie. On pourrait considérer les taxons comme des zones de probabilité de présence d'individus cellulaires dans un espace multi-dimensionnel dont chaque dimension serait représentée par un critère de classification. Il est bien entendu que cet espace serait « continu » et que les zones pourraient avoir des intersections, ce qui pourrait expliquer les changements d'espèces, les variations, fluctuations, mutations, ségrégations. Malheureusement, une telle optique requiert une analyse taxinomique de l'individu cellulaire et non de ses descendants. Il faudrait que les méthodes d'analyse se perfectionnassent à un point tel qu'une cellule suffise dans la détermination de ses caractères. Souhaitons que des méthodes de ce type puissent être mises au point dans un futur pas trop lointain.

B) *MATERIEL ET METHODES*

1) SOUCHES (voir V A)

a. *Saccharomyces Calsbergensis* PY 76 — I et II
b. *Saccharomyces Calsbergensis* B 101 — I et II
c. *Saccharomyces Uvarum* CLVUC — I et II
d. *Saccharomyces Logos* B 106 — I et II
e. *Saccharomyces Cerevisiae* B 169 — I et II

2) MILIEU : voir II B 2 avec en plus :

a. *Milieu au maltose,* composé de
— Yeast Nitrogen Base Difco
— Maltose en solution aqueuse à 2 %

b. *Milieu de Gorodkowa* pour la sporulation

c. *Blocs de plâtre* pour la sporulation

3) INSTRUMENTS (voir II B 3)

4) MÉTHODES : voir II B 4 avec en plus :

a. *Sporulation :*

— milieu de présporulation : gélose au moût de bière.

— au bout de trois jours, les colonies sont transférées sur le milieu de sporulation. L'observation est faite toutes les semaines pendant deux mois.

b. *Isolement et transfert des spores :*

A l'aide du micromanipulateur de Fonbrune, les spores sont transférées dans de l'extrait de malt liquide.

C) *RESULTATS ET DISCUSSION*

1) Résultats

Analyse des souches après leur passage en milieu avitaminé.

a) *Saccharomyces Calsbergensis* PY 76 II

i) *Morphologie :*

Les cellules sont rondes, plus petites que celles de la souche PY 76. Elles poussent en étoile dans le milieu avitaminé de Wickerham et forment de petits îlots, ce qui leur donne une sédimentation très rapide. Dans le moût de bière, elles restent petites (3 à 5 μ), sphériques, mais sont bien détachées en général. Le sédiment est de consistance poudreuse. Les colonies sont plus petites que celles de la variété PY 76 I. Dans le moût de bière, elles produisent une odeur caractéristique du beurre rance due à la présence en excès de diacétyle. Une analyse faite par la méthode de Owades (1964) donne 50 parties par million de diacétyle. On sait que cette substance a, à très faible teneur, une action favorable sur l'odeur et le goût ; elle est, au contraire, désagréable lorsque la concentration s'élève par trop (au-dessus de 30 parties par million pour la bière).

ii) *Fermentation et assimilation des sucres :*

TABLEAU IX

Sucres	Fermentation	Assimilaion
Glucose	+	+
Galactose	—	—
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	+ (ε)	+
Raffinose	+ 2/3	

iii) *Sporulation :*

On obtient des spores très petites au bout de 6 semaines à raison de quatre pas asque sur blocs de plâtre. Cependant, le pourcentage de sporulation est très faible (0,5 %). Une seule spore par asque semble grossir. Lorsqu'elles sont transférées sur milieu au moût, de bière, elles ne se développent pas. Leur rareté et leur nonviabilité indiquent que la souche PY 76 II est un diploïde illégitime.

b) *Saccharomyces Calsbergensis* B 101 II

i) *Morphologie* (4 à 7 μ) :

Cellules sphériques (4 à 7), donc plus petites que celles de la variété de B 101 I mais cependant plus grosses que celles du type PY 76 II. En milieu pauvre, forment facilement un pseudo-pycelium, mais sont très bien détachées dans le moût de bière. Les colonies sont plus petites que celles de B 101 I et deviennent brunes en vieillissant. Il n'y a pas d'odeur de beurre rance.

ii) *Fermentation et assimilation des sucres :*

TABLEAU X

Sucre	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	—	—
Raffinose	+ 1/3	

iii) *Sporulation :*

Nous n'avons pas réussi à observer de spores de cette souche, même au bout de deux mois. Cependant, par analogie avec les autres, nous supposons qu'elle est diploïde. Le fait que la sporulation soit très difficile, sinon impossible, nous incite à la considérer comme un diploïde illégitime.

iv) *Mutation :* Formation d'un pigment rouge.

En laissant la souche B 101 II au soleil par inadvertance, nous avons observé le développement d'un pigment rouge. En transplantant la culture dans des milieux divers, nous nous sommes aperçus que les cellules pigmentées se développaient plus vite que les non-pigmentées dans un milieu au maltose (VB2a) et ainsi, nous avons réussi à les isoler. C'est donc une mutation vraie et stable qui a été produite. Ceci indique que la variété B 101 II est haploïde, ou diploïde illégitime, étant donné la facilité avec laquelle elle a muté.

c) *Saccharomyces Uvaru* CLVUC II

i) *Morphologie :*

Les cellules sont allongées et beaucoup ont la forme d'un cylindre. Elles ont à peu près la même taille que la souche CLVUC I. Mais, les colonies sont très différentes de celles du type de départ CLVUC I. Elles sont très bombées, alors que celles de CLVUC I étaient plates. Sur gélose au vert de bromocrésol, elles sont entièrement blanches, alors que celles de CLVUC I ont le centre et les bords verts (toutes observations faites au bout de trois jours).

ii) *Fermentation et assimilation des sucres :*

TABLEAU XI

Sucres	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	—	
Raffinose	+ 1/3	

iii) *Sporulation :*

Au bout de quatre semaines, on voit des spores relativement nombreuses (22) sur blocs de plâtre et sur gélose Gorodkowa. On aperçoit, d'abord, quatre petites sphères très réfringentes à l'intérieur d'une asque sphérique. Après 5 semaines, une seule des spores s'est développée et peut être

distinguée facilement en contraste de phase : on y différencie bien sa membrane et son noyau. Les trois autres spores dégénérées peuvent être confondues avec des inclusions cytoplasmiques. Aucune des spores transférées dans du moût de bière n'a donné naissance à une culture : elles ne sont pas viables.

Fig. 21

Sporulation de S. Uvarum II

d) *Saccharomyces Logos* B 101 II

i) *Morphologie :*

Les cellules de la variété B 106 II sont plus petites que celles de la souche initiale B 106 I. Elles sont ellipsoïdes et très régulières, bien détachées. Les colonies sont petites, très bombées, d'un jaune qui a tendance à foncer avec le temps.

ii) *Fermentation et assimilation des sucres :*

TABLEAU XII

Sucres	Fermentation	Assimilation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	—	—
Mélibiose	—	
Raffinose	+ (1/3)	

iii) *Sporulation :*

Les spores sont relativement nombreuses (1,5 %). Elles sont rondes ou très légèrement ovoïdes avec un noyau central très réfringent. On les trouve sur les blocs de plâtre au bout de trois semaines. Au moment de l'observation, il n'y en avait qu'une par asque. Comme celles des autres variétés précitées, elles ne sont pas viables.

e) *Saccharomyces Cerevisiae* B 169 II

Aucune différence n'a été observée par rapport à la souche Saccharomyces Cerevisie B 169 I. (Voir II C 1 f).

2) Discussion

Nous avons ainsi observé des changements importants dans le patrimoine enzymatique des levures après le passage en milieu avitaminé. Si l'on s'en tient aux méthodes taxinomiques proposées par Lodder, on devra conclure que :

— *Saccharomyces Calsbergensis* PY 76 II est identique à *S. Pastorianus.*

— *Saccharomyces Calsbergensis* B 101 II est identique à *S. Cerevisiae.*

— *Saccharomyces Logos* B 104 II est identique à *S. Cerevisiae* var. *Ellipsoïdeus.*

— *Saccharomyces Uvarum* CLVUC II est identique à *S. Willianus.*

Cependant, nos recherches nous incitent à penser qu'une diploïdisation illégitime a eu lieu, ainsi qu'une ségrégation. Par conséquent, la plus grande prudence est nécessaire dans le changement des noms d'espèces (voir introduction de ce chapitre).

Les Lindegren avaient déjà observé que des souches haploïdes obtenues par sporulation et isolement des spores perdaient la faculté de fermenter certains sucres comme le saccharose, le maltose ou le galactose. Ils admettent même, comme règle que les souches haploïdes sont inférieures ou à la rigueur égales dans leur pouvoir fermentaire aux souches diploïdes (qualitativement et quantitativement).

Ceci montre que les résultats que nous avons obtenus ne sont pas aberrants. Nous sommes sûrs d'avoir affaire à des diploïdes puisqu'ils sporulent. Ceci prouve donc bien qu'il y a eu effectivement diploïdisation illégitime, et vient appuyer la théorie de Lindegren que certains genres ou espèces n'ont pas de validité. Par exemple, *Zygosaccharomyces* est une espèce homothallique par mutation de signe. *Torulopsis* est la phase haploïde d'un *Saccharomyces* hétérothallique, etc...

En résumé de cette discussion, reportons-nous au tableau ci-dessous, où nous proposons d'expliquer génétiquement ce qui s'est passé dans le milieu avitaminé.

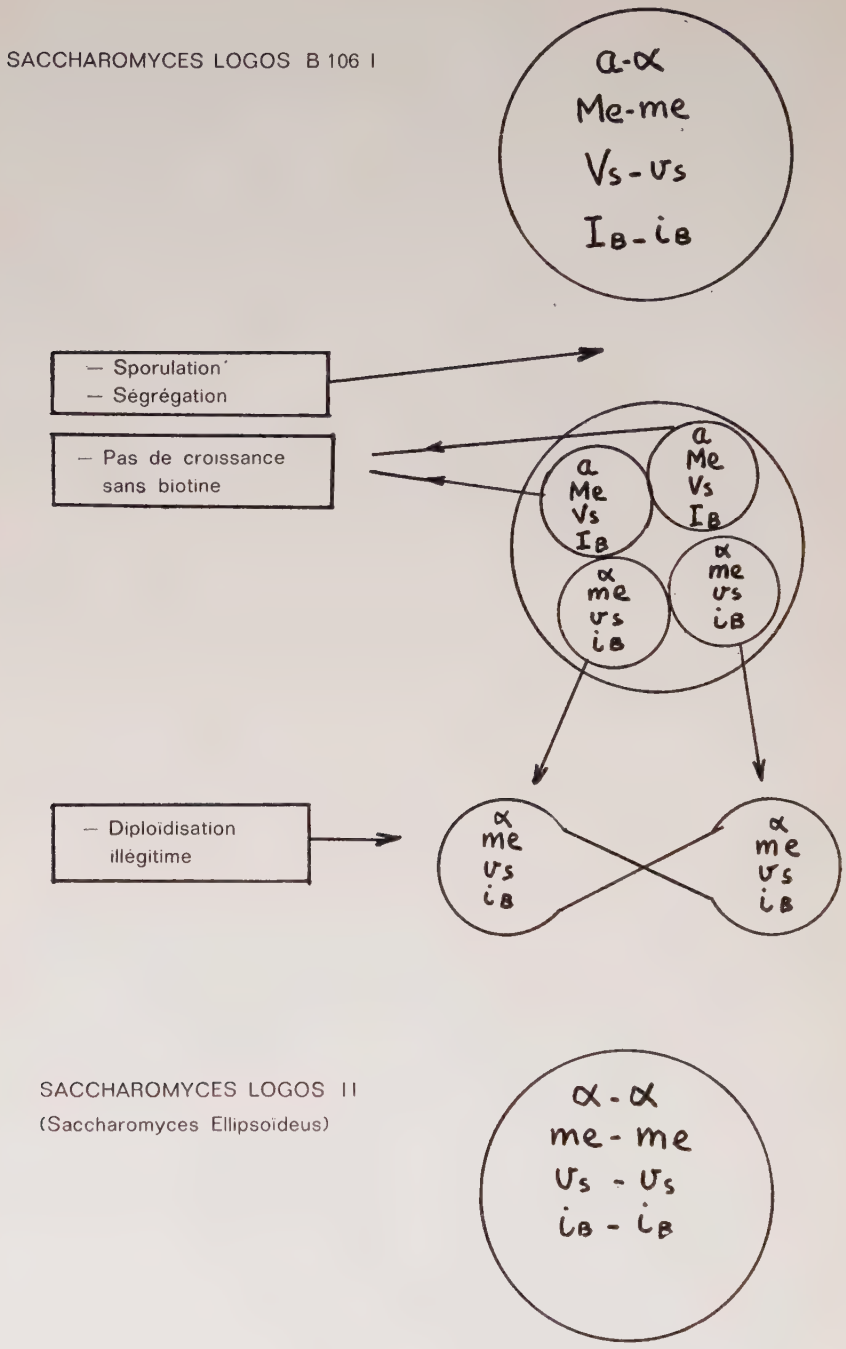

SACCHAROMYCES LOGOS B 106 I
a-α
Me-me
Vs-vs
IB-iB
— Sporulation
— Ségrégation
— Pas de croissance sans biotine
a Me Vs IB
a Me Vs IB
α me vs iB
α me vs iB
— Diploïdisation illégitime
α me vs iB
α me vs iB
SACCHAROMYCES LOGOS II
(Saccharomyces Ellipsoïdeus)
α - α
me - me
vs - vs
iB - iB

Fig. 22

Symboles pour la figure 22 :

a

Signes des thalles.

x

Me : Gène dominant pour la fermentation du mélibiose.

me : Gène récessif pour la fermentation du mélibiose.

Vs : Gène dominant pour la viabilité des spores.

vs : Gène récessif pour la viabilité des spores.

IB : Gène dominant pour la formation de l'inhibiteur.

iB : Gène récessif pour la formation de l'inhibiteur.

Ga : Gène dominant pour la fermentation du galactose.

ga : Gène récessif pour la fermentation du galactose.

Comme exemple, nous allons prendre *Saccharomyces Logos* et étudier les transformations que cette espèce a subies au cours du passage en milieu avitaminé.

Ce schéma est extrêmement simplifié et ne peut rendre compte de toute la vérité. En effet, il est vraisemblable que la ségrégation n'est pas mendélienne et il se peut que les 4 spores soient différentes, ce qui expliquerait l'apparition de quatre séries successives de croissance dans le milieu GN que nous avons décrites précédemment, chacune des spores engendrant, après des temps variables, une population (ou une phase de croissance). Cependant, on peut dire que, dans cette hypothèse, seules les spores dans lesquelles le gène inhibiteur de biotine est récessif sont viables dans le milieu avitaminé. D'autre part, pour une souche donnée, d'autres gènes accompagnent ce gène, selon la théorie de *loci* de Lindegren, 1949) : pour *Saccharomyces Logos* B 104 les gènes me, Vs, et le signe du thalle ; pour *Saccharomyces Carlsbergensis* PY 76, les gènes ga, vs, et le signe du thalle.

D) *CONCLUSION GENERALE*

Il est intéressant pour les industriels comme pour les taxinomistes de pouvoir reconnaître différentes souches à l'intérieur d'une espèce donnée. Pour les levures, le typage dit par le bios est une méthode de subclassification très utilisée, on peut dire même universelle. Cependant, il convient de l'appliquer avec discernement. Il faut tenir compte notamment des différentes sortes d'exigences en vitamines. A cet effet nous proposons un nouveau type de biogramme qui permet d'apercevoir d'un seul coup d'œil les différents types d'exigence. Par exemple, *Saccharomyces Cerevisiae* B 169 exige absolument pour sa croissance de la biotine, partiellement l'inositol, la thiamine et l'acide nicotinique, et d'une façon adaptative l'acide pantothénique. Elle n'a pas besoin de pyridoxine. *Saccha-*

romyces Uvarum CLVUC exige absolument la biotine, partiellement la thiamine, d'une façon adaptative l'acide pantothénique et la pyridoxine. Mais ni l'acide nicotinique, ni l'inositol ne lui sont nécessaires. Le biogramme proposé rend compte clairement de ces exigences. Cependant, on peut voir que pour les souches *S. Carlsbergensis* PY 76 et *S. Logos* B 106 il existe un doute quant à leur besoin en biotine.

En effet ces souches finissent par pousser en milieu avitaminé si on leur en laisse le temps. Ce phénomène se produit même pour des souches qui exigent la biotine de façon absolue, comme *S. Uvarum* CLVUC et *S. Carlsbergensis* B 101. Nous nous sommes aperçus qu'il intéressait en général les souches qui fermentent le glucose, le saccharose, le maltose et le raffinose complètement, c'est-à-dire celles des espèces de *Saccharomyces Carlsbergensis, Logos,* et *Uvarum.* Il semble y avoir une relation génétique entre la possibilité de fermenter le mélibiose et celle de synthétiser la biotine. *S. Cerevisiae* qui ne fermente pas le mélibiose est incapable de pousser en milieu avitaminé.

Lorsqu'on examine les levures qui poussent en l'absence de biotine on constate qu'elles sporulent au bout de quelques jours. On observe ensuite une conjugaison des spores. L'œuf qui germe donne naissance à un diploïde capable de synthétiser la biotine. Mais ce diploïde a perdu la faculté de fermenter un sucre (souvent le mélibiose et parfois le galactose). De plus les spores qu'il peut former ne sont pas viables. Certaines souches sont facilement sujettes à des mutations, telles que la formation d'un pigment rouge. Nous tirons de ces faits les conclusions suivantes :

La sporulation est provoquée par l'absence de biotine, selon un mécanisme de régulation analogue à celui que Jacob, Monod et Lwoff ont proposé. Cette sporulation est accompagnée d'une ségrégation (ou délétion) dans laquelle le gène inhibiteur de la synthèse de la biotine disparaît, ainsi que plusieurs autres gènes (fermentation du mélibiose, du galactose, viabilité des spores).

Deux spores ségrégantes de même nature génétique (donc de même signe) se conjuguent et donnent naissance à un diploïde illégitime capable de synthétiser la biotine mais incapable de fermenter soit le mélibiose soit le galactose, et dont les ascospores ne sont pas viables.

Nous n'avons pas apporté dans ce travail de preuves substantielles à l'hypothèse pour laquelle Jacob, Monod, et Lwoff ont reçu le prix Nobel. Cependant, elle explique très bien les faits que nous avons observés, et pour cela elle s'avère très utile dans la compréhension de la régulation cellulaire des levures.

APPENDICE

A) GLOSSAIRE

Ascopore : Spore provenant d'une asque.

Asque : Sac contenant des spores, provenant d'un œuf ou d'une cellule diploïde ayant subi la réduction chromatique (méiose et mitose) et contenant de 1 à 17 spores selon l'espèce et les conditions de sporulation.

Diploïdisation : C'est le passage de la phase haploïde (a) à la phase diploïde (2n). Selon l'endroit où elle se place dans le cycle de vie de la levure, on distingue :

— les **haplobiontes** : la diploïdisation a lieu juste avant la formation de l'asque. Les spores sont haploïdes et donnent naissance à des cellules, donc des cultures haploïdes ;

— les **diplobiontes** : la diploïdisation a lieu dans l'asque et la première cellule végétative est diploïde ;

— les **haplodiplobiontes** : la diploïdisation a lieu en un endroit indéterminé entre la germination des spores et la formation des asques, entre cellules haploïdes végétatives. La cellule diploïde résultante n'est jamais une asque.

Plusieurs auteurs ont découvert un signe dans les ascopores. Par exemple : dans une asque de 4 spores, on trouve 2 spores de type a (ou +) et 2 spores de type α (ou —). On a alors affaire à une hétérozygote hétérothallique. La diploïdisation légitime se fait entre 2 cellules de signes différents. La diploïdisation illégitime se fait entre deux cellules de même signe. Le thalle illégitime ainsi produit donne difficilement des spores, et celles-ci ne germent pas ou très mal. De plus, chez les diploïds illégitimes, on remarque des mutations récessives nocives, par exemple : perte de la capacité de fermentation d'un sucre. Il est possible également que la non viabilité des spores soit causée par un gène récessif. Les recessions n'apparaissent pas dans le diploïde légitime parce qu'elles sont masquées par les allèlles dominants du noyau de l'autre signe. C'est pourquoi les capacités des diploïdes légitimes sont supérieures ou égales à celles des haploïdes ou des diploïdes illégitimes.

Exigences : Dans ce texte, nous ne parlerons que des exigences en vitamines.

— **Exigence nulle** : L'absence de la vitamine ne se fait pas sentir sur la croissance de la levure.

— **Exigence partielle :** L'absence de la vitamine se traduit par une croissance plus lente.

— **Exigence adaptative** : Au début la croissance est indécelable. Après une certaine période d'adaptation, elle prend un taux normal.

— **Exigence absolue** : La croissance est très faible ou nulle.

Levure : Il n'est pas possible de donner une définition correcte des levures puisqu'on en trouve dans différentes classes de champignons : dans les ascomytètes, les sporobolomycètes et les cryptococcacées.

— **Levure humide** : dans ce texte, c'est la levure telle qu'on peut l'obtenir en prenant une colonie sur gélose, c'est-à-dire de consistance pâteuse.

— **Levure sèche** : Levure obtenue après séchage en étuve pendant 3 heures à 105° C. La levure humide contient de 25 à 33 % de levure sèche. Pour réaliser les ensemencements à un titre constant, nous avons choisi arbitrairement 30 %.

Morphologie : Dans ce texte, nous donnons à ce mot deux significations :

— l'une à l'échelon du microorganisme : forme et dimensions de la cellule.

— l'autre à l'échelon de la colonie : couleur, taille, aspect, forme, matité ou brillance.

Mutation génétique : Changement héréditaire et stable du génotype. Elle concerne un gêne chromosomique.

Mutation cytoplasmique : Changement non héréditaire et instable d'éléments cytoplasmiques structuraux autres que le noyau (on parle parfois de gênes cytoplasmiques).

Pseudomycelium : Filament formé par des cellules allongées ayant pour origine le bourgeonnement. Ce filament est souvent branché (dichotomie).

Raffinose : Le raffinose est un triboloside composé d'un diholoside, le mélibiose, et de fructose. Le mélibiose est composé de galactose et de glucose. Lorsque seul le fructose est fermenté, on dit que le raffinose n'est fermenté que pour un tiers, symbole : R 1/3. Lorsque le fructose est fermenté ainsi que la partie glucose du mélibiose, alors que le galactose ne l'est pas, on dit que le raffinose est fermenté aux deux tiers, symbole : R 2/3. Quand le fructose, le mélibiose, le galactose et le glucose sont fermentés, on dit que le raffinose est complètement fermenté, symbole : R 3/3.

Sédimentation : Voir floculation.

Ségrégation : Changement observé dans les propriétés physiologiques et morphologiques des microorganismes lors de l'haploïdisation d'un hétérozygote. Ces changements peuvent être conservés dans le cas d'une diploïdisation illégitime.

Souches : Subdivision de l'espèce. Une espèce peut comprendre plusieurs souches. Les souches se différencient entre elles par de légères différences dans les propriétés physiologiques et morphologiques mineures.

Taxinomie : Classification des espèces.
— **Taxon**: groupe taxinomique. Terme adopté au congrès international de botanique, 1950.

Variation : Changement dans les propriétés physiologiques et morphologiques d'une espèce de microorganismes. Les variations comprennent les mutations et les ségrégations.

Vitamines : Certains facteurs de croissance. Dans ce texte, nous n'étudions que celles qui peuvent être nécessaires à la croissance des levures, c'est-à-dire, quelques vitamines du groupe B :

— Biotine	symbole	Biot.
— Inositol	»	Inos.
— Pantothénate de calcium	»	Ca Pa
— Thiamine	»	Thia.
— Pyridoxine	»	Pyri.
— Nicotinamide	»	Niac.

B) BIBLIOGRAPHIE

AHEARN D. & ROTE F. — *Developments in Industrial Microbiology,* 1962, 3, 163-71.

AHMAD F. & ROSE A. — *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 1962, 97, 308-18.

AMAHA M. & TAKEUCHI M. — *Journal of the Institute of Brewing,* 1961, 67, 339-44.

ATKIN L., FRAY P., MOSES W. et FEINSTEIN M. — *Wallerstein Laboratories, Communications,* 1949, 12, 133.

ATKIN L., MOSES W. et GRAY P. — *Journal of Bacteriology,* 1949, 57, 575.

ATKIN L., SCHULTZ A., FREY C. — *Archives of Biochemistry,* 1942, 1, 9.

AXELROD A., et MARTIN C. — *Annual Review of Biochemistry,* 1961, 30.

BAUCH R. — *Naturwissenschaften,* 1941, 27, 503 - 687.

BAUCH R. — *Naturwissenschaften,* 1942, 30, 263 - 420.

BEIJERINK M. — *Archives Néerlandaises de Physiologie,* 1910, 2.

BRIGGS M. — *New-Zesland Journal of Science,* 1961, 4, 565 - 593.

BUREHOLDER P. — *Annual Journal of Botany,* 1943, 30, 206.

COHN M., MONOD J. — *In* « Adaptation in microorganisms », 1953, Cambridge University Press, p. 132.

COMANDON J. et de FONTBRUNE P. — *Annales de l'Institut Pasteur,* EPAF, 60, 113.

CAMPBELL L. et WILLIAMS O. — *Journal of Bacteriology,* 1963, 65, 141.

DITLEVSEN E. — *Compte rendus des travaux des Laboratoires Carlsberg,* 1944, 24, 24, 31.

DIXON B. et ROSE A. — *Journal of General Microbiology,* 1964, 35, 411 - 19.

EPHRUSSI B., L'HERITIER P. et NOTTINGUER H. — *Annales de l'Institut Pasteur,* 1949, 77, 64.

EPHRUSSI et NOTTINGUER. — *Nature,* 1950, 166, 956.

EPHRUSSI B. — « *Genetics of the 20th Century* », Dunn, éditeur Mc Millan, N.Y., 1951.

EPHRUSSI B., NOTTINGUER N. et CHIMENE. — *Annales de l'Institut Pasteur,* 1949, 76, 351.

EPHRUSSI B. et LEDERER P. — *Experientia,* 1948, 4, 433.

ERSHOFF B. — *Procédures de la Société Expérimentale de Biologie Médicale,* 1952, 79, 580.

FABIAN F. et WICKERMAN L. — *Journal of agricultural Research,* 1937, 54, 147.

DE FONBRUNE P. — « Technique de Micromanipulation », 1 vol. Masson, éd., Paris, 1948.

DE FONBRUNE P. — *Le Micromanipulateur pneumatique et la Microforge,* une plaquette, Ch. Beaudouin, éd., Paris, 1948.

FRAMAGEOT C., TCHANG J. — *Archiv für Mikrobiologie,* 1938, 9, 424-34.

FUKUI S. et TANI Y. — *Bitamin* (Kyoto), 1960, 20 (4), 572-81.

GILLILAND R. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1950, 24, 331.

GLAUBITZ M. — *Brennerei Zeitung,* 1942, 59, 85.

GOTO S. — *Hakke Kogabu Zuushi,* 1963, 39, 105-709.

GREEN S. et GRAY P. — *Wallerstein Laboratoires Communications,* 1950, 18, 357.

GREEN S. et SULLIVAN P. — *ASBC Proceedings,* 1959, 154.

HAENS B., GLAUBITZ H. et FURK H. — *Wochenschrift für Brauerei,* 1943, 60, 11.

HENRICI A. — *Bacteriology Review,* 1941, 5, 97.

HENRICI A. — « Molds, Yeasts and Actinomycetes », 1947, deuxième édition.

JACOB F. et MONOD J. — *Bulletin de la Société de Chimie Biologique,* 1964, 46, (12), 1499, 1532.

JACOB F. et MONOD J. — *Journal of Molecular Biology,* 1961 a, 3, 318.

KIRSOP B. — *Journal of the Institute of Brewing,* 1955, 466.

KLEYN J. — *Wallerstein Laboratoires Communications,* 1954, 17, 91-102.

KLUYVER A. — *Biochemische surkerbepalurgen* (thèse) Delft, 1914.

KLUYVER A. et GUSTERS M. — *Antoine Van Leeuwenhock,* Journal of Microbiology & Serology, 1939-40, 6, 121.

KURAISHI H. — *Science Reports of Tohoku University,* 4th series, 1957, 23, 68-72.

KURAISHI H. — *Science Reports of Tohoku University,* 4th series, 1959, 25, 246-61.

LEONIAN L. et LILLY V. — *American Journal of Botany,* 1942, 29, 245.

LEUPOLD U. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg :* 1950, 24, 381.

LEVAN A. — *Hereditas,* 1944, 30, 255.

LEVAN A. — *Nature,* 1946, 158, 626.

LEVAN A. — *Hereditas,* 1947, 33, 457.

LEVAN A. et SANDWALL C. — *Hereditas,* 1943, 29, 164.

LINDEGREN C. et LINDEGREN G. — *Annals of Missouri Botanic Gardens,* 1943, 30, 453.

LINDEGREN C. et LINDEGREN G. — *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 1947, 33, 314.

LINDEGREN C. — « The Yeast Cell, Its Genetics and Cytology », St. Louis, Missouri, U.S.A., 1949.

LODDER J. KREGER VAN RIJ. — « The Yeasts, A Taxonomic Study », North Holland Publishing Company, 1952, 1 vol.

LWOFF A. — *Bacterial Review,* 1953, 17, 269.

MCCLARY D., MULTY Y., MILLER G. — *Journal of Bacteriology,* 1959, 16, 362-8.

MCCLARY D., MULTY Y. et MILLER G. — *Journal of Bacteriology,* 1959, 6, 362-3.

MILLER J. — *Wallerstein Laboratories Communications,* 1959, 22, 267-83.

MILLER J. — *Canadian Journal of Microbiology,* 1963, 9, 259-77.

MILLER J., CALVIN J. et TREMAINE J. — *Canadian Journal of Microbiology,* 1954, 1, 560-73.

MILLER J., SCHEIBER C., GABRIEL O. et HOFFMANN-OSTENHOF O. — *Monatshefte für Chemie und vervandte Teile anderer Wissenshaften,* 1954, 83, 271-4.

MILLER J., SCHEIBER E., GABRIEL O. et HOFFMAN-OSTENHOF O. — *Monatshafte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenshaften,* 1957, 88, 417-20.

MILLER J., SCHEIBER E., GABRIEL O. et HOFFMAN-OSTENHOF O. — *Canadian Journal of Microbiology,* 1959, 5, 153-9.

MOLISCH H. — « Mikrochemie der Pflauze », Jena, 1921.

MONOD J. et COHN E. — *Advances in Enzymology,* 1952, 13, 67.

MOREAU F. — « Les Champignons », 1953, Paul Lechevalier Ed., 2 vol.

MRAK E. et BOUAR L. — *Mycologia,* 1938, 30, 182.

MRAK E., PHAFF H. et MACKINNEY G. — *Journal of Bacteriology,* 1949, 57, 609.

MUNDKUR B. — *Nature,* 1949, 164, 614.

MUNDKUR B. et LINDEGREN C. — *American Journal of Botany,* 1949, 36, 722.

NACHEV L. — *Investiya Mikrobiologhicheski Institut,* Sofiya Akad Nauk, 1963, 15, 43-52.

NADSON C. et KONOKOTINE A. — *Annales de Sciences Naturelles, Botanique et Biologie Végétale,* 1926, 8, 156-82.

NAKANISHI S. et TSUKAHARA T. — *Journal of the Society of Brewing* (Japan), 1954, 49, 471-5.

NYBERG C. — *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskankheiten und Hygiene,* AbteilungII, 1935, 82, 163.

PEYNAUD E. et LAFOURCADE S. — 10e *Congrès International des Industries, Agricoles et Alimentaires,* Madrid, 1954, 1678-87.

PHAFF H. et MRAK E. — *Wallerstein Laboratories Communications,* 1948, 11, 151.

PHAFF H. et MRAK E. — *Wallerstein Laboratories Communications,* 1948, 11, 151.

PHAFF H. et MRAK E. — *Wallerstein Laboratories Communications,* 1949, 12, 20.

REAUME S. et TATUM E. — *Archives of Biochemistry,* 1949, 22, 331.

RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E. et LAFON M. — *Compte-rendus,* 1954.

RIVALIER E. et SEYDEL S. — *Compte-rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1932, 40, 181.

RIVALIER E. et SEYDEL S. — *Annales de Parasitologie Humaine comparée,* 1932, 10, 444.

ROSE A. — *Journal of General Microbiology,* 1963, 31, 151-60.

ROSE M., COMMUNAL R. et MAZELLA O. — *Archives de la Société de Physiologie,* 1956, 10, 381-421.

SARUKANYAN F., AKINYAN R. et KARUMYAN E. — *Izvestiya Akademiyn Armiya SSR, Biologiya Nauk,* 1964, 17 (6), 23-8.

SCHAEFFER H. et BHARGAVA P. — *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 1962, 51, 1116-7.

SCHULTZ A. et ATKIN L. — *Archives of Biochemistry,* 1947, 14, 369.

SKEGGS H. — *Analytical Microbiology,* 1963, 421-43.

SKINNER C. — *Bacteriological Reviews,* 1947, 11, 227.

SKOVSTED A. — *Compte-rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1945, 24, 249.

SLOAN B., ROUTIEN J. et MILLER V. — *Mycologia,* 1960, 52, 47-63.

SONNEBORN T. — *Heredity,* 1950, 4, 11.

SPIEGELMAN S. et LINDEGREN C. — *Annals of the Missouri Botanic Garden,* 1944, 31, 219.

SPIELGELMAN S. et LINDEGREN C. — *Journal of Bacteriology,* 1945, 49, 257.

SPIEGELMAN S., LINDEGREN C. et HEDGECOCE L. — *Proceedings of the National Academy of Science,* 1944, 30, 13.

SPIECELMAN S. et DUNN R. — *Journal of General Physiology,* 1948, 31, 158.

STREUTKER R. — *Wallerstein Laboratories Communications,* 1959, 22, 27.

SUBRAMANIAM M. — *Current Science,* 1945, 14, 234.

SUZUKI Y. — *Nippon Nagey Kagaiku Kaishi,* 1961, 35, 648-54.

SZEP I. — *Elelm Ipar,* 1962, 16, 338-42.

TAKAHASHI M. — *Journal of Agricultural Chemical Society* (Japon), 1954, 28, 395.

TAKETA M. et TORAJI T. — *Nippon Jozo Kyokai Zasshi,* 1962, 57, (12), 1109-11.

TERROINE T. — « Vitamines et Hormones », Ed. Harris et Ingle, Presses Académiques, 1960, 18, 1-42.

THAYSEN A. et MORRIS M. — *Nature,* 1943, 152, 526.

TREMAINE J. et MILLER J. — *Botanical Gazette,* 1954, 115, 311-22.

VEROHA O. et PICCI G. — *Annali della sperimentazione agraria* (Rome), 1954, 8, 1965-74.

WALT J. VANDER. — *On the Yeast « Candida Pulcherrima » and its pigments* (thèse) Delfe, 1952.

WEINFURTNER, ESCHENBECKER et BORGS. — *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektionskankheites und Hygiene,* Abteilung II, 1959, 113, 128-33.

WEITAKEE J. et UMBREIT W. — *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 1962, 96, 541-4.

WICKERNAM L. — *Technical Bulletin* n° 1029, U.S. Department of Agriculture, 1951.

WICKERHAM L. et BURTON K. — *Journal of Bacteriology,* 1948, 56, 363.

WICKERHAM L. — *Journal of Bacteriology,* 1943, 46, 501.

WICKERHAM L. — *Journal of Bacteriology,* 1946, 52, 293.

WICKERHAM L. et DUPRAT E. — *Journal of Bacteriology,* 1945, 50, 597.

WICKERHAM L., FLICKINGER M. et BURTON K. — *Journal of Bacteriology,* 1946, 52, 611.

WILDIERS E. — *La Cellule* 1901, 18, 313.

WINDISCH S. et HERBST A. — *Brauerei Wissenschaften,* 1958, 11, 133.

WINCE O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1935, 21, 77.

WINGE O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1944, 24, 79.

WINGE O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1947, 24, 223.

WINGE O. — *Scientia Genetica,* 1962, 2, 167-71.

WINGE O. — *Report, Proceeding of the 4th International Congress of Microbiology,* 1949, 83.

WINGE O. — *Hereditas,* volume supplémentaire, 1949, 520.

WINGE O., LAUTSEN O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1937, 22, 99.

WINGE O. et LAUTSEN O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1938, 22, 235.

WINGE O. et LAUTSEN O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1938, 22, 235.

WINGE O. et LAUTSEN O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1939, 22, 337-57.

WINGE O. et LAUTSEN O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,*

WINGE O. et LAUTSEN O. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1940, 23, 17.

WINGE O. et ROBERTS C. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1948, 24, 263.

WINGE O. et ROBERTS C. — *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg,* 1950, 25, 35.

WINGE O. et ROBERTS C. — *Nature,* 1950, 166, 1114.

Vu

Le Président de la Thèse

Vu

Le Doyen

Vu et permis d'imprimer

CAEN, le 16 décembre 1965

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université

Imprimerie OZANNE et C^ie^ - CAEN Dépôt légal n° 610